



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**RAPHAEL AMANCIO DE JESUS**

**Cromatografia Líquida e análises quimiométricas na  
diferenciação química de acessos de *Lippia alba* (Mill) N. E.  
Brown e potenciais biológicos**

***Liquid Chromatography and chemometric analysis for the  
chemical differentiation of access of *Lippia alba* (Mill) N. E.  
Brown and biological potentials***





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**RAPHAEL AMANCIO DE JESUS**

**Cromatografia Líquida e análises quimiométricas na  
diferenciação química de acessos de *Lippia alba* (Mill) N. E.  
Brown e potenciais biológicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Sergipe, para a obtenção do título de Mestre em Química.

**Orientador: Profa. Dra. Valéria Regina de Souza Moraes**

***Liquid Chromatography and chemometric analysis for the  
chemical differentiation of access of Lippia alba (Mill) N. E.  
Brown and biological potentials***

*Dissertation presented to the Graduate Program in Chemistry of the Federal University of Sergipe to obtain MSc. in Chemistry.*

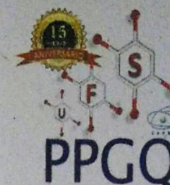


**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

J58c	<p>Jesus, Raphael Amancio</p> <p>Cromatografia Líquida e análises quimiométricas na diferenciação química de acessos de <i>Lippia alba</i> (Mill) N. E. Brown e potenciais biológicos; orientador Valéria Regina de Souza Moraes. - São Cristóvão, 2018. 183 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, 2018.</p> <p>1. Química analítica. 2. Análise cromatográfica. 3. Plantas medicinais. 4. Erva-cidreira. I. Moraes, Valéria Regina de Souza. II. Título.</p> <p>CDU 54:633.88</p>
------	---



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
Programa de Pós-Graduação em Química  
PPGQ



### FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Raphael Amâncio de Jesus apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 20/02/2018.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valéria Regina de Souza Moraes  
Departamento de Química - UFS

Prof. Dr. Sandro Navickiene  
Departamento de Química - UFS

Prof. Dr. Moacir dos Santos Andrade  
Departamento de Química do Campus de Itabaiana - UFS



## RESUMO

A metodologia desenvolvida no presente trabalho, utilizando *fingerprint* cromatográfico por CL-DAD e Análise de Componentes Principais (PCA), se mostrou adequado para a diferenciação química de acessos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown, considerando o método de extração (infusão e maceração hidroalcoólica) e a época de coleta (verão e inverno), permitindo, ainda, avaliar a influência destas variáveis na composição química dos extratos obtidos. Adicionalmente, todos os extratos foram submetidos a testes citotóxicos frente a duas linhagens de células tumorais, HL-60 (leucemia humana) e HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), e de inibição enzimática frente a acetilcolinesterase (AChE) com o intuito de avaliar qual a forma de extração e qual acesso é o mais promissor do ponto de vista farmacológico. Entre todos os extratos analisados frente as células tumorais, dois provenientes da infusão: **01II** e **02II** e seis da extração hidroalcoólica: **02HI**, **24HI**, **39HI**, **54HI**, **01HV** e **24HV**, apresentaram melhores desempenhos de inibição frente a HL-60, com percentual de inibição entre 40,0 e 52,0%, sugerindo que estes extratos são potencialmente promissores contra esta linhagem. Com relação aos testes anticolinesterásicos, todos os extratos estudados apresentaram baixo efeito inibidor da AChE quando comparados a galantamina (87,4%), com destaque para os extratos **01HI** (28,4%), **02HI** (27,2%), **54HI** (29,3%), **01HV** (32,7%), **02HV** (27,4%) e **24HV** (30,3%). Através das análises realizadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi possível identificar as estruturas de alguns dos compostos isolados a partir desta espécie: a flavona tricina e o fenilpropanóide verbascosídeo/isoverbascosídeo. Além disso, foram propostas as classes de outros três metabólitos: dois derivados de fenilpropanóides e um flavonóide diglicosilado.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais; *Lippia alba*; CL-DAD; CL-SPE/RMN; *Fingerprint* cromatográfico; Análises quimiométricas.

## ABSTRACT

The methodology developed in the present work, through chromatographic fingerprint by LC-DAD and Principal Component Analysis (PCA), was adequate for the chemical differentiation of *Lippia alba* (Mill) NE Brown accessions, considering the extraction method (infusion and maceration hydroalcoholic) and the collection season (summer and winter), allowing to evaluate the influence of these variables on the chemical composition of extracts obtained. In addition, all extracts were submitted to cytotoxic tests against two tumor cell lines, HL-60 (human leukemia) and HepG2 (human hepatocellular carcinoma), and to inhibition tests against the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in order to evaluate the form of extraction and which access is the most promising from a pharmacological point of view. Among the extracts analyzed against tumor cells, eight of them, two from the infusion: **01IW** and **02IW** and six from the hydroalcoholic extraction: **02HW**, **24HW**, **39HW**, **54HW**, **01HS** and **24HS**, presented better cell inhibition performances against HL-60, with percentage of inhibition between 40.0 and 52.0%, suggesting that these extracts are potentially promising against this lineage. With respect to the anticholinesterase tests, all extracts studied had low AChE inhibitory effect when compared to galantamine (87.4%), highlighting only the samples **01HW** (28.4%), **02HW** (27.2%), **54HW** (29.3%), **01HS** (32.7%), **02HS** (27.4%) and **24HS** (30.3%). Through the analyzes performed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) it was possible to identify the structures of some compounds isolated from this species: flavone tricetin and phenylpropanoid verbascoside/isoverbascoside. In addition, the classes of three other metabolites were proposed: two phenylpropanoid derivatives and one flavonoid diglucoside.

**Keywords:** Medicinal plants; *Lippia alba*; LC-DAD; LC-SPE/NMR; Chromatographic fingerprint; Chemometric analysis.

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
1.1 Plantas medicinais: um potencial a ser estudado	3
1.1.1 Efeitos adversos à saúde decorrentes do uso indiscriminado de plantas medicinais	7
1.1.2 Monitoramento de preparações obtidas de plantas medicinais	8
1.2 Cromatografia Líquida, Fingerprints cromatográficos e Quimiometria	10
1.3 Técnicas Hifenadas: Cromatografia Líquida-Extração em Fase Sólida-Ressonância Magnética Nuclear (CL-SPE-RMN)	15
1.4 Atividade biológica	16
1.4.1 Atividade antitumoral	16
1.4.2 Atividade anticolinesterásica	19
1.5 Revisão da literatura	22
1.5.1 Gênero <i>Lippia</i> (Família: Verbenaceae)	22
1.5.2 <i>Lippia alba</i> (Mill) N. E. Brown	33
1.5.3 Fingerprints cromatográficos e Análise de Componentes Principais (PCA)	39
<b>2 OBJETIVOS</b>	40
2.1 Geral	40
2.2 Específicos	41
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	41
3.1 Materiais e equipamentos	41
3.2 Sistemas cromatográficos	42
3.3 Colunas cromatográficas e capilares	44
3.4 Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear	44
3.5 Coleta das folhas e preparo dos extratos de <i>Lippia alba</i>	44
3.6 Preparo das amostras, condições cromatográficas de análise e análises quimiométricas	46
3.7 Isolamento e identificação estrutural dos compostos químicos	47
3.8 Estudo de citotoxicidade em linhagens de células tumorais <i>in vitro</i>	49
3.9 Estudo da atividade de inibição enzimática <i>in vitro</i>	50
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	53
4.1 Preparação dos extratos aquosos e hidroalcoólicos	53
4.2 Condições cromatográficas de análise	54
4.2.1 Análises cromatográficas no sistema semi-preparativo	55
4.2.2 Análises cromatográficas no sistema analítico	77
4.2.3 Aquisição dos fingerprints cromatográficos dos extratos de <i>L. alba</i>	84
4.3 Análise Quimiométrica: Análise de Componentes Principais (PCA)	91
4.4 Análise por RMN das substâncias químicas isoladas por CL-DAD-SPE	103
4.4.1 Identificação da substância R4	104
4.4.2 Identificação das substâncias R2 e R6	114
4.4.3 Identificação da substância R9	122
4.4.4 Identificação da substância R3	128
4.5 Estudo de citotoxicidade em linhagens de células tumorais <i>in vitro</i>	136
4.6 Estudo da atividade de inibição enzimática <i>in vitro</i>	139
<b>5 CONCLUSÃO</b>	143

<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS DO TRABALHO</b> .....	<b>145</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>146</b>

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde e oportunidades concedidas;

À Universidade Federal de Sergipe, pela oportunidade na instituição, e Ao Programa de Pós Graduação em Química, Departamento de Química (UFS), pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado concedida;

À Profa. Dra. Valéria Regina de Souza Moraes, pela orientação, incentivos e apoio durante este trabalho de mestrado;

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar de Lima Nogueira, pelos inúmeros conselhos e ensinamentos durante o desenvolvimento do trabalho;

À todos os Professores do PPGQ (DQI-UFS), em especial ao Prof. Dr. Sandro Navickiene, pelos ensinamentos e enriquecedoras conversas sobre as técnicas cromatográficas;

Ao Prof. Dr. Arie Fitzgerald Blank do Laboratório de Culturas de Tecidos Vegetais e Melhoramento Vegetal do Departamento de Engenharia Agrônômica da UFS, por nos fornecer os acessos de *Lippia alba*;

Ao Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra da FIOCRUZ-Bahia, pela realização dos ensaios de atividades citotóxicas;

A Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso e a Dra. Claudia Seidl do Grupo de Cromatografia de Bioafinidade e Produtos Naturais da Universidade de São Paulo (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Departamento de Química), pela realização dos ensaios de inibição enzimática;

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira, Prof. Dr. Tiago Venâncio e a Msc. Thayana da Conceição Alves pelo acolhimento na Universidade Federal de São Carlos e ensinamentos durante as análises realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Departamento de Química (DQ-UFSCar);

Aos amigos e colegas pelos momentos de descontração, companheirismo e colaboração.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima Acetilcolinesterase
AChE <sub>eel</sub>	Enzima Acetilcolinesterase isoforma de peixe elétrico
ACN	Acetonitrila
ACN- <i>d</i> <sub>3</sub>	Acetonitrila deuterada
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BChE	Enzima Butirilcolinesterase
C <sub>18</sub>	Octadecilsilano
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CL	Cromatografia Líquida
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<i>d</i>	Dubleto
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DA	Doença de Alzheimer
<i>dd</i>	Duplo Dubleto
<i>di</i>	Diâmetro Interno
<i>dt</i>	Duplo Tripleto
DOX	Doxorrubicina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
<i>dp</i>	Diâmetro de Partícula
EC	Eletroforese Capilar
EM	Espectrometria de Massas
EMA	European Medicines Agency
ESI	Electrospray Ion Source (Fonte de Ionização por Electrospray)
FDA	Food and Drug Administration
<i>g</i> COSY	gradient Correlated Spectroscopy
<i>g</i> HMBC	gradient Heteronuclear Bond Correlation
<i>g</i> HSQC	gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence
HCA	Hierarchical clustering analysis (Análise de Agrupamentos)

	Hierárquicos)
HCOOH	Ácido Fórmico
HD-I	Extrato hidroalcoólico da coleta de inverno
HD-V	Extrato hidroalcoólico da coleta de verão
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano
HL-60	leucemia promielocítica humana
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICER	Immobilized Capillary Enzyme Reactor
INF-I	Extrato preparado por infusão da coleta de inverno
INF-V	Extrato preparado por infusão da coleta de verão
IV	Radiação Infravermelha
$J$	Constante de Acoplamento
$K_{mapp}$	Constante de Michaelis-Menten
KNN	K-Nearest Neighbor
LA	<i>Lippia alba</i>
LC	Liquid Chromatography
$m$	Múltiplo
MeOH	Metanol
MeOH- $d_4$	Metanol deuterado
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-3-H-brometo de tetrazolium
$m/z$	Razão massa/carga
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCA	Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais)
PCs	Principal Component (Componentes Principais)
pH	Potencial Hidrogeniônico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP	Reconhecimento de Padrões
RPMI 1640	Meio de cultura celular
$s$	Singleto
SIMCA	Soft-Independent Modeling of Class Analogy
SPE	Solid Phase Extraction
SRB	Sulforrodamina B

SUS	Sistema Único de Saúde
$t$	Tripleto
$tl$	Tripleto Largo
UV	Radiação Ultravioleta
UVB	Radiação Ultravioleta B
VIS	Radiação na região do Visível
XDH	Enzima Xantina Desidrogenase
XOD	Enzima Xantina Oxidase
$\delta$	Deslocamento químico, em ppm

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fotografias da espécie <i>L. alba</i> .	34
<b>Figura 2:</b> Forma e local de armazenamento das folhas de <i>L. alba</i> .	45
<b>Figura 3:</b> Cromatogramas adquiridos a partir do extrato <b>02IV</b> , utilizando vazão da fase móvel de 1,0 mL/min e volume de injeção de 25 µL, em diferentes comprimentos de onda (nm): 254 (Preto); 280 (Azul); 320 (Vermelho); 360 (Verde).	58
<b>Figura 4:</b> Comparação entre os cromatogramas adquiridos utilizando-se gradiente exploratório linear, empregando-se como fase móvel: ACN:H <sub>2</sub> O (1 e 3) e ACN:HCOOH 0,5% (v/v) (2 e 4), utilizando as fases estacionárias C <sub>18</sub> e hexil-fenil.	61
<b>Figura 5:</b> Otimizações cromatográficas utilizando-se o modo gradiente de eluição, para a obtenção do perfil cromatográfico de <i>L. alba</i> , empregando-se vazão de 1,0 mL/min e detecção em 254 nm.	63
<b>Figura 6:</b> Efeito da temperatura da coluna (22 a 32°C) na separação cromatográfica utilizando-se o gradiente de eluição <b>12</b> : 5-15% de B em 10 min; 15-23% de B em 55 min; 23-35% de B em 5 min; 35-35% de B em 5 min; 35-5% de B em 10 min, e detecção até 75 min em 254 nm.	67
<b>Figura 7:</b> Otimizações cromatográficas adicionais utilizando-se o modo gradiente de eluição, temperatura da coluna a 24 °C, com vazão de 1,0 mL/min e detecção em 254 nm.	69
<b>Figura 8:</b> Comparação da eficiência de separação das colunas C <sub>18</sub> LUNA® (A) e C <sub>18</sub> Kinetex® (B), utilizando a condição <b>12T24</b> e detecção até 70 min em 254 nm.	70
<b>Figura 9:</b> Comparação entre os cromatogramas dos extratos obtidos a partir do acesso LA02 nas duas épocas de coleta: (A) <b>02IV</b> e (B) <b>02II</b> , aplicando-se a condição <b>12T24</b> e detecção até 70 min em 254 nm.	72

- Figura 10:** Otimizações cromatográficas: (A) **16T24** (registrado até 85 min) e (B) **17T24** (registrado até 95 min), mantendo-se a temperatura da coluna a 24 °C e detecção em 254 nm. 73
- Figura 11:** Efeito da temperatura da coluna (24 a 50 °C) na separação cromatográfica do extrato **02II** empregando-se a otimização **17** e detecção em 254 nm. 75
- Figura 12:** Comparação entre os cromatogramas obtidos no sistema: **semi-preparativo** (A) e **analítico** (B), empregando-se a condição **17T45**, em 254 nm. 78
- Figura 13:** Comparação entre os cromatogramas obtidos no **sistema analítico**, empregando-se a condição: **17T45** (preto) e **18T45** (vermelho), com vazão de 1,0 mL/min, em 254 nm. 79
- Figura 14:** Comparação entre os cromatogramas obtidos no **sistema analítico**, empregando-se o gradiente de eluição **18**: 5-15% de B em 20 min; 15-19% de B em 40 min; 19-100% de B em 5 min; 100-100% de B em 10 min, com vazão da fase de: 0,8 mL/min (A); 1,0 mL/min (B) e 1,2 mL/min (C), mantendo-se a temperatura da coluna em 45 °C e detecção a 254 nm. 80
- Figura 15:** Cromatograma obtido empregando-se a condição **18T45** com vazão de 0,8 mL/min e detecção em 254 nm. 82
- Figura 16:** Cromatograma 3D (entre 200 e 400 nm) do extrato **02II** utilizando a condição **18T45**, com vazão de 0,8 mL/min e detecção até 60 minutos. 83
- Figura 17:** Comparação entre os cromatogramas obtidos utilizando o comprimento de onda de 254 nm (preto) e 240 nm (vermelho), empregando-se a condição **18T45** e vazão de 0,8 mL/min. 84
- Figura 18:** Cromatogramas *fingerprint* dos extratos de *L. alba* (seis acessos diferentes, 01, 02, 24, 32, 39 e 54), preparadas de formas distintas e de épocas de coleta diferentes: (A) infusão-verão, (B) infusão-inverno, (C) hidroalcoólico-verão e (D) hidroalcoólico-inverno, 85



empregando-se a condição **18T45** e detecção em 240 nm.

- Figura 19:** Cromatogramas em quadruplicata obtidos das amostras de infusão da coleta de verão (IV) dos seis acessos de *L. alba*. 87
- Figura 20:** Cromatogramas em quadruplicata obtidos das amostras de infusão da coleta de inverno (II) dos seis acessos de *L. alba*. 88
- Figura 21:** Cromatogramas em quadruplicata obtidos das amostras hidroalcoólicas da coleta de verão (HV) dos seis acessos de *L. alba*. 89
- Figura 22:** Cromatogramas em quadruplicata obtidos das amostras hidroalcoólicas da coleta de inverno (HI) dos seis acessos de *L. alba*. 90
- Figura 23:** Parte do cromatograma (240 nm) dos extratos de *L. alba* após o alinhamento dos dados. 93
- Figura 24:** Gráfico de pré-processamento dos dados centrado na média. 94
- Figura 25:** Variância explicada (%) em cada Componente Principal (PC). 95
- Figura 26:** Gráfico de *scores* (PC1 versus PC2) das amostras de *L. alba*. 96
- Figura 27:** Gráfico de *scores* (PC1 versus PC2) das amostras de *L. alba*, destacando o método de preparação: hidroalcoólico (**vermelho**) e infusão (**marrom**). 99
- Figura 28:** Gráfico de *loadings* das amostras de *L. alba*: PC1 (**marrom**) e PC2 (**vermelho**). 101
- Figura 29:** Cromatograma representativo (a 240 nm) do extrato **54II** e espectros de absorção no UV (200 a 400 nm) das substâncias **R2**, **R3**, **R4**, **R6** e **R9** obtidos através do detector DAD do **sistema analítico**. 104
- Figura 30:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{ACN-}d_3$ ) da substância **R4** (A, de  $\delta_{\text{H}}$  8,0 a 0,0) e suas expansões: (B) entre  $\delta_{\text{H}}$  7,62 e 6,92; (C) entre  $\delta_{\text{H}}$  6,80 e 6,18; (D) entre  $\delta_{\text{H}}$  5,20 e 4,30; (E) entre  $\delta_{\text{H}}$  4,10 e 3,60; (F) entre  $\delta_{\text{H}}$  3,60 e 2,70 e (G) de  $\delta_{\text{H}}$  1,40 a 0,80. 105

**Figura 31:** Estruturas dos isômeros Verbascosídeo (A) e Isoverbascosídeo (B). 108

**Figura 32:** Mapa de contornos de *g*COSY (600 MHz, ACN-*d*<sub>3</sub>) da substância **R4** (A) e expansões (B e C). 109

**Figura 33:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) da substância **R2** 114  
(A, de  $\delta_H$  8,0 a 0,0) e suas expansões: (B) entre  $\delta_H$  7,65 e 6,90; (C) entre  $\delta_H$  6,85 e 6,20; (D) entre  $\delta_H$  5,40 e 4,30; (E) entre  $\delta_H$  4,10 e 3,10; (F) entre  $\delta_H$  3,0 e 1,70.

**Figura 34:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) da substância **R6** 118  
(A, de  $\delta_H$  7,75 a 0,0) e suas expansões: (B) entre  $\delta_H$  7,75 e 6,82; (C) entre  $\delta_H$  6,80 e 6,25; (D) entre  $\delta_H$  5,30 e 4,20; (E) entre  $\delta_H$  4,10 e 3,46; (F) entre  $\delta_H$  3,45 e 2,70 e (G) de  $\delta_H$  2,50 a 1,00.

**Figura 35:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) da substância **R9** 122  
(A, de  $\delta_H$  7,50 a 2,00) e expansão entre  $\delta_H$  7,00 e 6,48 (B).

**Figura 36:** Mapa de contornos *g*COSY (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) da substância **R9** (A) e expansão (B). 124

**Figura 37:** Mapa de contornos *g*HSQC (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) da substância **R9**. 125

**Figura 38:** Mapa de contornos *g*HMBC (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) da substância **R9** (A) e expansão (B), entre  $\delta_H$  7,62 e 6,92 com relação ao deslocamento químico do H. 126

**Figura 39:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) da substância **R3** 128  
(A, de  $\delta_H$  7,40 a 3,0) e suas expansões: (B) entre  $\delta_H$  7,40 e 6,50; (C) entre  $\delta_H$  5,50 e 4,50 e (D) entre  $\delta_H$  4,10 e 3,10.

**Figura 40:** Mapa de contornos *g*COSY (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) da substância **R3** (A) e expansão (B). 130

**Figura 41:** Mapa de contornos *g*HSQC (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) da substância **R3**. 132

**Figura 42:** Mapa de contornos  $g\text{HMBC}$  (600 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) da substância **R3** (A) e expansão (B). 133

**Figura 43:** Hidrólise enzimática da ACh à colina mediada pela AChE. 139

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Rendimento dos extratos aquosos e hidroalcoólicos preparados a partir das folhas de diferentes acessos de <i>L. alba</i> .	53
<b>Tabela 2:</b> Análises iniciais, utilizando gradiente exploratório linear, para a otimização das condições cromatográficas de separação do extrato <b>02IV</b> .	56
<b>Tabela 3:</b> Análises iniciais utilizando-se gradiente exploratório linear, com e sem o emprego de HCOOH a 0,5% (v/v) ao solvente aquoso, para a otimização das condições cromatográficas de separação do extrato <b>02IV</b> .	60
<b>Tabela 4:</b> Variância percentual das componentes principais calculadas para os dados da matriz original centrados na média.	94
<b>Tabela 5:</b> Dados de RMN $^1\text{H}$ e $g\text{COSY}$ da substância <b>R4</b> (600 MHz, $\text{ACN-}d_3$ ).	112
<b>Tabela 6:</b> Comparação dos dados de RMN $^1\text{H}$ da substância <b>R4</b> (600 MHz, $\text{ACN-}d_3$ ) com aqueles descritos na literatura para o verbascosídeo e isoverbacosídeo.	113
<b>Tabela 7:</b> Comparação dos dados de RMN $^1\text{H}$ das substâncias <b>R2</b> e <b>R6</b> (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ) com aqueles das substância <b>R4</b> (600 MHz, $\text{ACN-}d_3$ ).	121
<b>Tabela 8:</b> Dados de RMN 1D e 2D da substância <b>R9</b> (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ).	127
<b>Tabela 9:</b> Dados de RMN 1D e 2D da substância <b>R3</b> (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ).	134
<b>Tabela 10:</b> Comparação dos dados de RMN 1D e 2D da substância <b>R3</b> (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ) com aqueles descritos na literatura.	135
<b>Tabela 11:</b> Porcentagem de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais.	136
<b>Tabela 12:</b> Porcentagem de inibição enzimática da enzima AChE.	140

## 1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que ao longo da história sempre se fez uso de plantas medicinais e seus derivados para remediar ou curar diversos tipos de enfermidades, sendo uma alternativa terapêutica amplamente utilizada em vários países [1]. Os efeitos terapêuticos atribuídos a estas plantas se devem a presença de compostos químicos que apresentam atividades biológicas, trazendo benefícios para quem as utilizam [2].

Entre as diversas espécies de plantas utilizadas pela população para fins terapêuticos estão aquelas pertencentes ao gênero *Lippia*. Entre elas, é possível destacar a espécie *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown, conhecida popularmente no Brasil como erva-cidreira-de-arbusto, alecrim-selvagem e falsa-melissa, a qual é usada tradicionalmente no tratamento de diversas enfermidades, como problemas gastrointestinais e inflamações [3].

Além disso, a *Lippia alba* é uma planta que apresenta grande potencial para as indústrias farmacêuticas, de aromas, de perfumes e de produtos agrícolas, devido as suas comprovadas propriedades antifúngicas, inseticidas e repelentes. Isso se deve, principalmente, aos componentes majoritários encontrados em seus óleos essenciais como o carvacrol, o citral, o limoneno e a carvona [4, 5].

No entanto, produtos a base de plantas medicinais, quando utilizados de forma indiscriminada e/ou com base apenas no conhecimento popular, podem causar efeitos adversos a saúde humana devido, entre outros fatores, ao seu uso em quantidades excessivas, possibilidade de possuírem substâncias de caráter tóxico em sua composição, ou ainda, apresentarem algum tipo de adulteração e/ou contaminação [6-8]. Além disso, plantas medicinais possuem composição química de grande complexidade que pode variar de acordo com diversos fatores como, por exemplo, condições climáticas e tipo de solo em que a espécie se encontra, podendo afetar seu potencial terapêutico [9]. Consequentemente, torna-se necessário a existência de meios para que se possa realizar o monitoramento da eficácia, da segurança e da qualidade dessas preparações vegetais antes de sua comercialização.



Neste contexto, a OMS (Organização Mundial de Saúde) tem contribuído, a partir da criação de uma série de diretrizes, para avaliação da qualidade de derivados vegetais [7, 10]. Em contrapartida, esse controle de qualidade não é uma tarefa fácil, visto que cada país possui suas normas referentes a avaliação e regulamentação destes produtos, gerando um problema com relação a comercialização de forma legal entre países, culminando no comércio ilegal sem qualquer controle de qualidade [11, 12]. Além disso, existe uma ampla forma de distribuição destas ervas medicinais para a população como, por exemplo, em feiras livres e comércios populares, que são de difícil monitoramento [1, 13].

Desta forma, metodologias analíticas rápidas e versáteis voltadas para o controle de qualidade de plantas medicinais e seus derivados são necessárias. Neste sentido, a cromatografia líquida de alta eficiência, em especial, através da estratégia de *fingerprints* cromatográficos, tem se destacado, devido a sua alta sensibilidade, precisão, conveniência e rapidez das análises [14, 15]. Essa técnica de separação em conjunto com uma técnica de detecção apropriada pode ser capaz de separar, mapear e identificar substâncias bioativas sem a necessidade de etapas de isolamento e fracionamento tediosas, trabalhosas e dispendiosas, nas quais se faz uso de grande quantidade de solventes, que são muito prejudiciais ao meio ambiente [16].

Atualmente, as análises quimiométricas têm sido cada vez mais utilizadas como uma forma de auxiliar na análise e interpretação da grande quantidade de dados complexos que são gerados por cromatografia, tornando-se assim de fundamental importância e relevância no estudo de produtos de origem vegetal [10, 17].

Segundo Battisti *et al.* [18], a junção entre diferentes áreas de conhecimento, como a Química e a Biologia, é de fundamental importância para o estudo de plantas medicinais e seus derivados, possibilitando um maior conhecimento sobre determinada espécie vegetal, do ponto de vista químico e biológico/farmacológico. Isso contribui para a obtenção de novos produtos com potencial medicinal, que sejam mais eficientes e seguros.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um *fingerprint* cromatográfico, por CL-DAD, objetivando a diferenciação química, com o auxílio de ferramentas quimiométricas, de seis acessos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown, coletados durante o verão e o inverno, a partir dos extratos aquosos e hidroalcoólicos de suas folhas e avaliar a influência do método de extração e da sazonalidade na composição química dos extratos obtidos desta espécie. Além disso, avaliou-se o potencial citotóxico e anticolinesterásico destes extratos, a fim de contribuir para um maior conhecimento químico e biológico desta planta, auxiliando assim na escolha de indivíduos de *L. alba* destinados ao cultivo e obtenção de extrato vegetais que apresentem potencial farmacológico.

Adicionalmente, como uma tentativa de se obter maiores informações químicas sobre a *L. alba* foi realizado o isolamento por LC-DAD-SPE de alguns compostos presentes no extrato aquoso desta espécie preparado por infusão a partir das folhas do acesso 54 seguido por análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) uni (1D) e bidimensional (2D).

### **1.1 Plantas medicinais: um potencial a ser estudado**

A biodiversidade, que se refere ao conjunto de todas as espécies de seres vivos - plantas, animais e microrganismos - existentes no planeta, é uma fonte incomparável de substâncias com grande variedade química, estrutural e funcional, além de ser uma excelente alternativa para a descoberta e obtenção de novos bioprodutos, tais como fármacos e cosméticos [16, 19].

Nesse contexto, as plantas medicinais estão entre as principais fontes de moléculas com atividades biológicas de origem natural [2]. A utilização destas plantas é considerada uma das práticas mais antigas realizadas pelo homem para prevenir e tratar doenças. Essas plantas são, ainda hoje, muito utilizadas devido ao conhecimento popular a seu respeito passado de geração em geração durante séculos [1, 20].

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [21], planta medicinal é definida como a “espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos”.

Apesar do grande desenvolvimento da medicina moderna, ainda é significativa a utilização de produtos a base de plantas medicinais para o tratamento de doenças, onde estima-se que cerca de 25% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são obtidas a partir de plantas medicinais ou análogos sintéticos derivados destas ervas [12, 22].

Em um levantamento feito pela Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que cerca de 80% da população mundial, principalmente dos países em desenvolvimento, dependem exclusivamente das plantas medicinais como primeira opção para o tratamento básico de saúde [12, 23, 24].

O consumo de produtos à base de ervas medicinais está intimamente relacionado a dificuldade da população ao acesso a centros hospitalares ou obtenção de exames e medicamentos, principalmente nos países em desenvolvimento. Além disso, pode-se destacar a falta de condições econômicas para a aquisição de medicamentos industrializados e, ainda, a fácil obtenção e grande tradição no uso destas ervas. Adicionalmente, há também o crescente desejo de se adotar um estilo de vida “natural”, principalmente nos países desenvolvidos [23, 25]. Estes fatores contribuem para manter viva a prática do consumo de ervas medicinais em diversas partes do mundo [26].

No Brasil, estimativas mostraram que as plantas medicinais são utilizadas como o único recurso terapêutico para uma grande parcela da população. Em 2005, foi proposto, através do Sistema Único de Saúde (SUS), a inclusão das plantas medicinais e fitoterápicos como opções terapêuticas no sistema público de saúde, contanto que esses produtos atendam a legislação vigente [18, 26, 27].

Segundo Falzon e Balabanova [28] a fitoterapia se baseia no uso de plantas como forma de medicamento no tratamento de doenças ou como agentes promotores da saúde; em geral conservando, ao máximo, a composição química original e a integridade da matéria-prima vegetal, seja da(s) planta(s) inteira(s) ou frações desta(s), a ser usada para fins medicinais.

## Medicamentos fitoterápicos, segundo a ANVISA [21],

“são aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas, caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade, que não inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais.”

Ao longo dos anos notou-se um crescente interesse pelas plantas medicinais e seus derivados, como os fitoterápicos, o qual pode ser atribuído a diversos fatores. Dentre eles estão: os efeitos adversos de fármacos sintéticos; a preferência dos consumidores por tratamentos “naturais”; a validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, possibilitando um maior conhecimento farmacológico e clínico das drogas vegetais e seus derivados; o desenvolvimento de novos métodos analíticos destinados ao controle de qualidade; o desenvolvimento de novas formas de preparações e administrações de produtos vegetais; além, do menor custo, em geral, quando comparadas aos fármacos sintéticos [22, 29].

Estimativas apontam que o mercado mundial de produtos a base de plantas medicinais e fitoterápicos movimentam cerca de 21,7 bilhões de dólares anualmente. No Brasil, onde não existem dados oficiais atualizados, o setor chega a movimentar 160 milhões de dólares por ano [30].

Vale ressaltar que as plantas medicinais têm contribuído muito para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas devido aos seus metabólitos secundários, que podem servir como agentes farmacológicos, bem como materiais de partida para a síntese de fármacos ou, ainda, como modelos para a obtenção de novas moléculas com potencial farmacológico [12, 19, 31, 32].

Os metabólitos secundários são compostos químicos, de grande complexidade e diversidade estrutural e funcional, advindos de organismos naturais (plantas, microrganismos e animais) atuando no desenvolvimento, regulação, equilíbrio e defesa destes que os possuem. São conhecidos por

atuar de forma direta ou indireta no organismo, podendo inibir ou ativar importantes centros ativos em moléculas e células [32]; e quando obtidos exclusivamente de matérias-primas vegetais são especialmente conhecidos como fitoquímicos [33]. Estes compostos são de grande importância para a espécie humana, pois nos fornecem uma grande variedade de aplicações/utilidades, desde fármacos, alimentos e fragrâncias a cosméticos e agroquímicos [16, 19, 34].

Com relação ao consumo tradicional de plantas medicinais, diversas são as formas empregadas, sendo o chá preparado na forma de infusão a mais utilizada para fins terapêuticos [18, 35]. Outras formas populares de preparação/utilização relatadas na literatura são: chá na forma de decocção, emplastos, óleo, pomada e maceração (em água e/ou solventes orgânicos) [35, 36].

Segundo Zhao *et al.* [37], as preparações vegetais podem ser obtidas a partir de várias partes das plantas, tais como folhas, flores, sementes, caules, raízes e frutos. Além disso, muitas espécies de plantas são empregadas na culinária para adicionar sabor e aroma a alimentos e bebidas [38, 39].

O chá, além de ser a forma mais usual de consumo de plantas medicinais, é uma das bebidas mais antigas e mais consumidas mundialmente, ficando atrás apenas da água [40]. Além disso, essa bebida faz parte da dieta de milhares de pessoas e espalhou-se pelo mundo devido as suas propriedades medicinais e por possuir em geral sabor e aroma agradáveis [41, 42].

A literatura menciona o chá como uma das melhores fontes de compostos fenólicos, os quais possuem efeitos antioxidantes, antimutagênicos, e anticarcinogênicos favoráveis para a saúde humana [40-42]. As atividades benéficas referentes aos chás são atribuídas à presença de diversas substâncias químicas biologicamente ativas em sua composição como, por exemplo, flavonóides, polifenóis, alcalóides, iridóides, naftoquinonas, vitaminas e sais minerais [38, 41-43].

O chá das folhas de *Camellia sinensis* é relatado na literatura como uma bebida amplamente utilizada por possuir atividade antioxidante, anti-



inflamatório, antidiabética, anticarcinogênica e ação sobre doenças cardiovasculares. Tais benefícios são conferidos aos seus constituintes bioativos diversificados, tais como: polifenóis, alcalóides, terpenos e aminoácidos [44].

Diante do exposto, ficaram evidentes as potencialidades dos produtos de origem natural (ênfatizando as plantas medicinais), sendo de fundamental importância a existência de incentivos e investimentos para investigações científicas nesta área [18].

### **1.1.1 *Efeitos adversos à saúde decorrentes do uso indiscriminado de plantas medicinais***

Embora a utilização de plantas medicinais seja secular, um número relativamente pequeno de espécies medicinais existentes na natureza foram estudadas com relação aos seus potenciais medicinais [45]. Como consequência, pouco se sabe a respeito dos possíveis efeitos, sejam eles benéficos ou maléficos que, devido as suas características químicas, os diferentes tipos de plantas medicinais podem causar a quem as utilizam. Isto porque se sabe que o uso de plantas medicinais somente com base no conhecimento popular pode trazer riscos à saúde humana como qualquer tipo de medicamento [7].

Na maioria dos casos, as plantas medicinais utilizadas pela população, por apresentarem supostos efeitos terapêuticos, não possuem comprovação científica de tais propriedades por não terem sido investigadas, ou por não terem sido submetidas a testes científicos pré-clínicos ou clínicos [6, 8].

Na literatura há vários relatos sobre efeitos adversos causados a saúde humana pelo uso indiscriminado de plantas medicinais ou suas preparações sem o devido controle de qualidade e segurança. Entre estes problemas pode-se destacar: distúrbios gastrointestinais (como diarreia grave), hepatotoxicidade (danos no fígado causado por substâncias químicas) e aborto. A morte, muitas vezes, tornou-se a consequência final em casos mais extremos [6, 8].

Os problemas gerados pelo uso irracional de preparações medicinais estão, principalmente, vinculados a identificação equivocada da planta pelo comerciante e/ou fornecedor; adulterações em sua composição química, por mistura com outra(s) espécie(s) de planta(s) ou adição de alguma(s) substância(s) específica(s) e uso de plantas em quantidades excessivas, além de efeitos sinérgicos e interações entre os constituintes da planta e fármacos industrializados, que podem estar sendo utilizados concomitantemente [6, 7, 46].

Por consequência dos riscos inerentes ao uso de ervas medicinais, quando utilizadas de forma descontrolada, pesquisadores de várias áreas de conhecimento se juntam e, com o apoio da OMS e dos órgãos competentes de cada continente ou país, investigam melhores condições para se efetuar o controle de qualidade, que inclui a segurança e a eficácia, dos produtos de origem vegetal [7, 22].

### **1.1.2 *Monitoramento de preparações obtidas de plantas medicinais***

Atualmente, farmácias, lojas de produtos naturais, feiras e comércios populares são os principais meios de comercialização de plantas medicinais e seus derivados, onde a maioria das preparações oferecidas não possui certificado de eficácia, segurança e qualidade. Este fato pode contribuir para o agravamento e/ou surgimento de problemas de saúde pública, visto que as plantas medicinais são, muitas vezes, a primeira opção terapêutica para uma grande parcela da população mundial, geralmente utilizadas sem acompanhamento de profissionais de saúde [13, 25, 47]. Desta forma, faz-se necessário investigar se esses produtos estão sendo oferecidos aos consumidores de acordo com a legislação específica e critérios de qualidade estabelecidos cientificamente [22, 29].

Neste sentido, a OMS desenvolveu diretrizes para o monitoramento de plantas medicinais e seus derivados, fornecendo orientações técnicas para a verificação da segurança e eficácia, bem como para o controle de qualidade destas preparações e assim contribuir para a troca de informações e

comercialização desses produtos entre regiões e/ou países, de forma confiável. Essa medida tem como principais objetivos minimizar a carência de informações sobre plantas medicinais, identificar e prevenir eventuais efeitos adversos que podem ser ocasionados pelo uso descontrolado dessas ervas [7, 18, 22].

No entanto, cada continente e/ou país possui suas normas específicas a serem seguidas no que se refere ao controle e regulamentação de medicamentos. Essa não uniformidade com relação às normas regulamentadoras existentes entre os países dificulta o controle de qualidade e a comercialização, de forma segura, dos produtos a base de plantas medicinais [11, 12].

No Brasil, cabe a ANVISA tomar as providências cabíveis para que apenas medicamentos, incluindo os fitoterápicos, seguros e eficazes sejam liberados para comercialização e uso [30, 48]. Na Europa, esse papel é cumprido pela *European Medicines Agency* (EMA) e nos Estados Unidos da América, essa função é assumida pela *Food and Drug Administration* (FDA) [12].

Segundo Melo *et al.* [29] a segurança e a eficácia dos produtos de origem vegetal a serem comercializados dependem de diversos fatores, entre eles pode-se destacar a qualidade. A qualidade é a garantia da identidade do medicamento e de que ele produzirá o efeito pretendido [48].

A qualidade de preparações vegetais pode ser influenciada por diversos fatores. Entre eles pode-se destacar a variação qualitativa e/ou quantitativa da composição química das plantas medicinais e suas preparações devido a efeitos tais como variações climáticas, local e época de coleta (sazonalidade), condições fisiológicas e genéticas da planta, tempo de armazenamento, condições de secagem e processo de extração [9, 46, 49].

A alteração da composição química das plantas medicinais pode afetar seu potencial terapêutico e/ou das suas preparações, além de dificultar o controle de qualidade e o monitoramento da segurança desses derivados vegetais [9, 50].

Contudo, no que diz respeito a investigação fitoquímica de derivados vegetais, a aplicação de técnicas avançadas e robustas como as diferentes modalidades cromatográficas (como a Cromatografia Líquida – CL e Cromatografia Gasosa – CG) e a Eletroforese Capilar – EC acopladas a diversas técnicas de detecção e/ou identificação de substâncias químicas como a Espectrometria de Massas (EM), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-VIS) e Infravermelho (IV), trouxeram grandes avanços nessa área, possibilitando o monitoramento da qualidade destas preparações e a determinação estrutural e/ou isolamento da(s) substância(s) ativa(s) de interesse, bem como a escolha de seus derivados potencialmente promissores para estudos adicionais de atividades biológicas/farmacológicas [16, 19, 51].

## **1.2 Cromatografia Líquida, *Fingerprints* cromatográficos e Quimiometria**

Considerando a crescente demanda da população por alternativas terapêuticas baseadas em plantas medicinais, torna-se de fundamental importância a existência de metodologias analíticas adequadas para a autenticação destas ervas [16, 52].

A Cromatografia Líquida – CL (LC, do inglês, *Liquid Chromatography*) é uma técnica de separação, análise e/ou purificação de amostras constituídas por um grande número de componentes não voláteis e/ou termicamente instáveis, os quais não são determinados em cromatografia gasosa [53-55]. Assim, a Cromatografia Líquida torna-se uma das técnicas mais poderosas para a análise de extratos de plantas, cuja composição química é bastante complexa [37, 56, 57].

No que se refere a autenticação de amostras vegetais, as análises por *fingerprints* são aceitas pela OMS e FDA como uma metodologia para a avaliação e controle de qualidade de preparações a base de plantas medicinais [52, 58]. Ultimamente, as principais estratégias utilizadas para a obtenção de *fingerprints* envolvem as técnicas cromatográficas (como a CL e CG),

Eletroforese Capilar (EC) e métodos espectroscópicos de análises, especialmente RMN e IV [51, 59].

Nos últimos tempos, a tecnologia por *fingerprints* cromatográficos tem se destacado entre as demais, sendo empregada para avaliação e identificação de falsificações/adulterações em medicamentos industrializados e produtos derivados de ervas medicinais, constituindo-se, muitas vezes, por misturas de duas ou mais plantas diferentes, tornando-se de difícil análise [56]. Essa metodologia também vem sendo utilizada para se estudar, entre outros fatores, o efeito da sazonalidade, origem geográfica e/ou variabilidade genética na composição química de plantas medicinais, além de auxiliar na discriminação de espécies vegetais [15, 60].

Técnicas hifenadas que acoplam uma técnica de separação com uma ou mais técnicas de detecção, tais como CL-DAD, CL-DAD-EM, CL-DAD-RMN e CG-EM, estão sendo cada vez mais importantes e, por isso, mais utilizadas para o monitoramento da qualidade de amostras vegetais [16, 59, 61]. O emprego destas técnicas permite a separação, identificação e/ou quantificação dos compostos existentes (conhecidos ou inéditos) em determinada preparação e, assim, fornecer uma informação completa do material estudado, podendo auxiliar na avaliação de riscos à saúde pública [56, 57].

De modo geral, um cromatograma *fingerprint* caracteriza-se por demonstrar a complexidade química de uma amostra vegetal através da melhor separação possível de um maior número de compostos, guardando as devidas ressalvas com relação ao método cromatográfico e tipo de detector utilizado [14,15].

Dentre as estratégias utilizadas para a obtenção de *fingerprints* cromatográficos, a CL-DAD se destaca entre as várias técnicas hifenadas, como a CL-EM e CL-RMN, com relação a análise de extratos vegetais [10]. Isso se deve a sua eficiência, baixo custo, especialmente em comparação com o sistema de detecção por EM ou RMN, e ao fato de que uma grande quantidade de compostos absorve radiação eletromagnética no UV-VIS (compostos que possuem grupos cromóforos), podendo ser, então, analisados desta maneira (UV-VIS/DAD) [62, 63, 64].

Contudo, devido a grande quantidade e complexidade dos dados gerados pelas técnicas cromatográficas, como a CL-DAD, o uso de métodos quimiométricos torna-se necessário para o tratamento e obtenção de informações relevantes a partir destes dados originais, de forma a contribuir para tornar as análises na área da Química mais rápidas e objetivas [10, 17, 65].

A Quimiometria pode ser definida como a ciência que emprega métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para investigar, interpretar, classificar e fazer previsão de conjuntos de dados de interesse químico [10,66]. No Brasil, a maioria dos trabalhos que empregam a Quimiometria estão relacionados a uma das suas três principais áreas: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões (métodos de análise exploratória e classificação) e calibração multivariada [67].

Em geral, um conjunto de dados químicos é constituído por um determinado número de objetos (amostras) e descrito por certo número de variáveis. Em Química, os objetos podem ser compostos, amostras analíticas, espectros de UV, cromatogramas, entre outros. As variáveis químicas são propriedades e características dos objetos como, por exemplo, concentração dos elementos majoritários, altura da banda em um cromatograma ou intensidade de absorção em diferentes comprimentos de onda [67].

O método de reconhecimento de padrões (RP) é uma das principais vertentes do uso da Quimiometria em Química Analítica, empregado com a finalidade de tratar os dados analíticos, através de ferramentas computacionais que permitem a exploração dos resultados obtidos em análises químicas com o intuito de verificar a existência de similaridades entre as amostras estudadas [68]. As principais aplicações desse método incluem: análise exploratória de dados, classificação de amostras e resolução de curvas [67].

Os métodos de análise exploratória de dados são uma das principais ferramentas da Quimiometria utilizada com o objetivo de extrair informações e encontrar padrões de associação no conjunto de dados, pretendendo-se estabelecer relações entre objetos e variáveis, além de agrupar amostras a

partir de uma grande quantidade de informações (dados) adquiridas por meio delas [66, 68].

De forma geral, os métodos de análise exploratória são classificados como supervisionados e não supervisionados. Nos métodos supervisionados como, por exemplo, a regra dos vizinhos mais próximos (KNN, do inglês, *K-Nearest Neighbor*) e modelagem independente para analogia de classes (SIMCA, do inglês, *Soft-Independent Modeling of Class Analogy*) são necessários conhecimentos iniciais sobre a identidade das amostras para a formação de classes entre elas. Seu objetivo é desenvolver um modelo com base nas informações contidas nas amostras. Em contrapartida, os métodos não supervisionados, com destaque para a Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA, do inglês, *Hierarchical clustering analysis*), as quais são as mais utilizadas nesta modalidade, têm como objetivo identificar agrupamentos naturais entre as amostras analisadas. Neste caso, a separação das classes ocorre sem levar em consideração qualquer informação prévia sobre a natureza destas amostras [66].

No presente trabalho, será abordado com mais detalhes somente a PCA, que foi a ferramenta utilizada para a interpretação dos dados cromatográficos obtidos.

A PCA é uma ferramenta quimiométrica que permite reduzir a dimensão dos dados originais (sem perda de informações importantes), extrair informações de maior relevância a partir de um determinado conjunto de dados e verificar a existência, ou não, de amostras anômalas (*outliers*) [69]; sendo considerada um método exploratório porque auxilia na elaboração de hipóteses a partir dos dados coletados [70]. Além disto, a PCA serve como base de fundamentação para o desenvolvimento de outros métodos quimiométricos como a SIMCA [71].

A PCA tem por finalidade a redução da dimensão dos dados originais a partir da decomposição de uma matriz  $X$  (com  $N$  linhas e  $M$  coluna) construída por esses dados. Assim, a dimensão dos dados originais é diminuída para um menor conjunto de dimensões chamadas de Componentes Principais (PCs).

Como resultado desse processo, dois novos conjuntos de dados são gerados através das PCs, denominados *scores* (**T**) e *loadings* (**L**). Os *scores* e *loadings* trazem, respectivamente, informações relevantes sobre as amostras e as variáveis [69, 72]. Matematicamente, podemos ilustrar a redução da dimensionalidade do conjunto de dados, por PCA, da seguinte forma:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TL}^T + \mathbf{E}$$

Onde **X** é a matriz original decomposta em um produto de duas matrizes, *scores* (**T**) e *loadings* (**L**<sup>T</sup>, onde T sobrescrito é o operador de transposição da matriz), mais uma matriz de erro (**E**) [71].

Desta forma, o conjunto de dados originais passa a ser representado em um novo sistema de eixos (variáveis), as componentes principais (PCs). No espaço original, as amostras são pontos localizados em um espaço *n*-dimensional, onde *n* é igual ao número de variáveis. Na PCA, as amostras passam a ser pontos localizados em espaços de dimensões reduzidas definidos pelas PCs, permitindo a visualização e interpretação de uma grande gama de dados complexos em poucas dimensões como, por exemplo, gráficos bi ou tridimensionais [66].

A primeira componente principal, PC1, possui a maior quantidade de informações relevantes sobre os dados, correspondendo à direção de maior variância do conjunto de dados; a segunda componente principal, PC2, corresponde à direção de maior variância no espaço multivariado não modelado pela primeira (PC1), sendo, portanto, ortogonal a ela. As PCs subsequentes são traçadas no sentido de maior variância no espaço multidimensional não modelado pelas componentes anteriores, sendo todas sempre ortogonais entre si, e, por consequência, não correlacionadas [71].

Na PCA, cabe destacar a importância de se entender que os *scores* fornecem a composição das PCs em relação aos objetos (amostras) enquanto que os *loadings* fornecem essa mesma composição em relação as variáveis. Desta forma, como as PCs são ortogonais entre si, é possível examinar as relações de similaridades entre as amostras através do gráfico dos *scores* projetados nas primeiras PCs, bem como as relações entre as variáveis a partir do gráfico dos *loadings* [72]. Adicionalmente, através da análise conjunta do



gráfico de *scores* e *loadings* é possível estimar quais variáveis são responsáveis pelas diferenças e/ou agrupamentos observados entre as amostras analisadas [66, 72].

### **1.3 Técnicas Hifenadas: Cromatografia Líquida-Extração em Fase Sólida-Ressonância Magnética Nuclear (CL-SPE-RMN)**

Uma vez que a Cromatografia Líquida (CL) é uma das mais importantes técnicas utilizadas para separação de amostras em fase líquida e a Ressonância Magnética Nuclear - RMN (NMR, do inglês, *Nuclear Magnetic Resonance*) é uma técnica espectroscópica que possibilita a elucidação estrutural de compostos orgânicos como aqueles presentes em extratos e/ou frações derivadas de produtos de origem naturais, a junção entre essas duas técnicas fornece uma importante ferramenta analítica para a análise e determinação estrutural de compostos orgânicos conhecidos ou inéditos presentes em amostras complexas [73, 74].

Contudo, o acoplamento entre um sistema de CL e um instrumento de RMN apresenta um inconveniente, a baixa sensibilidade do instrumento de RMN quando comparado aos sistemas de detecção UV-VIS/DAD e EM. Consequentemente, com frequência torna-se necessário a existência de um estágio de pré-concentração dos analitos que saem do sistema cromatográfico (em relativamente baixa concentração) antes que estes possam ser analisados separadamente por RMN [73, 75, 76].

Uma alternativa eficiente para se alcançar a concentração necessária dos analitos a serem analisados em um instrumento de RMN foi a inserção de uma unidade de Extração em Fase Sólida - SPE (do inglês, *Solid Phase Extraction*) entre o sistema de CL e o equipamento de RMN [77].

A Extração em Fase sólida é um método comumente utilizado para a preparação da amostra e concentração dos analitos antes da análise por CL [78]. Quando acoplada ao sistema de CL e RMN, ela funciona como uma unidade de captura e concentração dos analitos que eluem da coluna

cromatográfica em pequenos cartuchos de SPE apropriados para esse tipo sistema [75, 77, 79].

De modo geral, a hifenação (ou acoplamento) entre a CL, a SPE e a RMN (CL-SPE-RMN), permite a separação dos constituintes químicos presentes em amostras complexas, o aumento da sua concentração e, portanto, a obtenção de espectros de RMN de alta qualidade, possibilitando assim a elucidação estrutural de substâncias de forma rápida e relativamente simples [80, 81], sem recorrer, a princípio, a etapas de isolamento e fracionamento convencionais como a extração líquido-líquido, que em geral são mais trabalhosas e custosas, requerendo grande quantidade de solvente [16].

Desta forma, a técnica hifenada CL-SPE-RMN, entre outras possibilidades, pode auxiliar nas pesquisas que visam relacionar, de forma rápida, os efeitos biológicos de extratos vegetais e/ou frações purificadas destes extratos aos seus constituintes químicos supostamente responsáveis por tais efeitos pela identificação destes constituintes na sua forma pura [82].

## **1.4 Atividade biológica**

### **1.4.1 Atividade antitumoral**

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células anormais que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. A rápida divisão destas células tende a ser muito agressiva e incontrolável, determinando a formação de tumores malignos (acúmulo de células cancerosas), também conhecidos como neoplasias [83].

Estimativas da OMS demonstraram que anualmente surgem mais de 10 milhões de novos casos de câncer com cerca de 8 milhões de mortes. Somente no Brasil, a estimativa para o ano de 2014 apontou para a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer [84].

Atualmente, várias estratégias têm sido empregadas no tratamento de diferentes tipos de câncer como cirurgia, rádio e quimioterapia. A quimioterapia, por exemplo, mostrou-se eficiente em muitos casos, no entanto o desenvolvimento de resistência e toxicidade, por parte das células cancerígenas, continua a ser um problema durante esse tratamento. Como consequência tem-se a necessidade de identificar novos agentes que demonstrem atividades quimioterápicas e quimiopreventivas [85]

Nas últimas décadas, a descoberta de medicamentos para o câncer está fortemente relacionada a pesquisas na área de produtos naturais, sendo que cerca de 60% dos medicamentos utilizados têm, de certa forma, sua origem relacionada a uma fonte natural [86].

Com base neste dado, pode-se observar que as plantas medicinais são uma fonte interessante de preparações e/ou compostos que possuem importantes propriedades farmacológicas, sendo de grande utilidade para a indústria farmacêutica. Como fonte destes compostos, os óleos essenciais e extratos, que são misturas complexas de substâncias produzidas pelo metabolismo secundário das plantas, geralmente apresentam múltiplas propriedades farmacológicas. Cada uma destas substâncias pode contribuir para os efeitos biológicos destes derivados vegetais [82, 87].

Contudo, prevalece a necessidade de estudos químicos e farmacológicos das plantas, buscando aquelas com atividades medicinais e como fonte de substâncias com potencial terapêutico contra doenças como o câncer e a malária, por exemplo [88].

No que se refere a investigação de possíveis agentes antitumorais, a utilização de testes de citotoxicidade *in vitro* é uma maneira rápida e simples para a determinação de compostos que têm ação anticâncer, especialmente os metabólitos secundários oriundos das plantas medicinais. Este teste é de grande importância já que o câncer está entre as três causas mais comum de morte na maioria dos países desenvolvidos e sua incidência cresce cada vez mais nos países em desenvolvimento. Os testes de toxicidades têm como objetivo avaliar a sobrevivência de indivíduos expostos a um agente ou amostra a ser analisada por um determinado tempo [89].

Os testes de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células neoplásicas (tumoriais) são importantes, ao menos, durante a fase inicial do processo de descoberta de novas preparações e compostos ativos, tendo reduzido os ensaios *in vivo* em animais, além de serem menos dispendiosos do que estes. Além disso, estes estudos permitem estabelecer correlação entre os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*, fornecendo informações suplementares aos estudos das neoplasias [90].

Levantamentos recentes revelam que os principais tipos de câncer que mais acometem pessoas no Brasil são o de pulmão, mama, intestino, próstata, estômago, fígado, colo do útero e leucemia [91].

Considerando este cenário, o estudo de plantas medicinais torna-se muito importante tendo em vista a grande biodiversidade brasileira, que não tem sido explorada de forma efetiva contra doenças desta magnitude. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo realizar a avaliação dos potenciais citotóxicos de extratos obtidos de *L. alba* frente as linhagens de células tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL-60 (leucemia humana) [88, 89, 92].

O ensaio de citotoxicidade em linhagens de células neoplásicas (*in vitro*) é considerado um parâmetro consistente para a detecção da atividade antitumoral. Os testes antitumorais são realizados através de vários métodos, entre eles os colorimétricos de inibição do metabolismo celular, tais como: Cristal violeta; MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium); Alamar blue e; SRB (sulforrodamina B), que são relativamente mais rápidos e menos dispendiosos quando comparados, respectivamente, a contagem de células manualmente e aquela realizada eletronicamente [13, 93].

O alamar blue identificado como resazurina é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Assim como os sais de tetrazólio, o alamar blue se reduz em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável) [94, 95].

A avaliação da viabilidade celular com o alamar blue é um método amplamente utilizado devido à sua rapidez, sensibilidade e baixo custo-

benefício; proporcionando a vantagem de realizar experiências simultâneas envolvendo, entre outros estudos, ensaios de apoptose (morte celular) e citogenética (estrutura e função celular) por não causar danos às células em estudo, não interferindo nos resultados de avaliação antitumoral de uma determinada amostra [96].

Sendo assim, para a avaliação das atividades antitumorais dos extratos preparados das folhas de *L. alba* foi utilizado o método do alamar blue.

#### **1.4.2 Atividade anticolinesterásica**

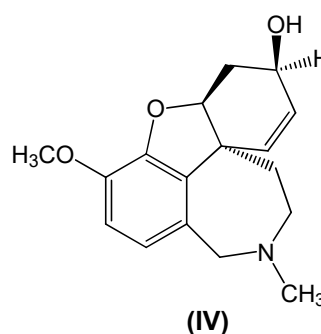
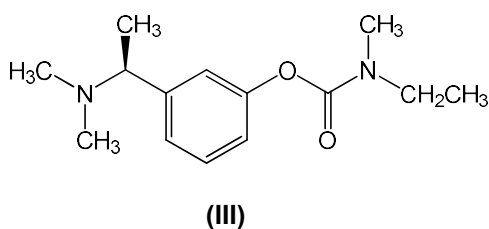
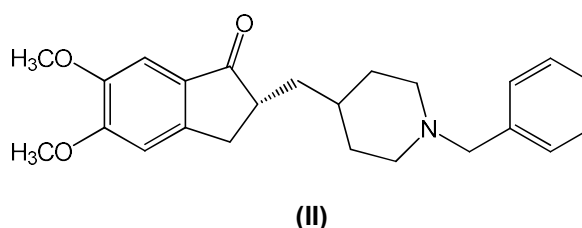
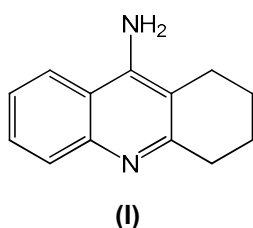
Atualmente, doenças relacionadas a distúrbios cognitivos, que acometem principalmente idosos, são cada vez mais frequentes como é o caso da doença de Alzheimer (DA). A DA é uma doença progressiva caracterizada pela degeneração da função neurológica (neurodegenerativa), sendo considerada a forma mais comum de demência [97]. Segundo levantamentos, essa doença acomete cerca de 20 a 40% da população com mais de 85 anos e 5 a 10% com idade superior a 65 anos [98].

Estima-se que cerca de 172 bilhões de dólares por ano sejam utilizados em gastos relacionados à doença de Alzheimer. A partir do início da doença, a expectativa de vida dos pacientes varia entre 3,3 e 11,7 anos. Portanto, a DA é uma doença permanente (não possui cura), dispendiosa e mortal que afeta o paciente com declínio funcional progressivo significativo [99]. Além do transtorno financeiro, essa doença traz transtornos emocionais e psicológicos aos familiares, visto que o tratamento é caro e os pacientes passam a não reconhecer seus familiares mais próximos com o avanço da doença [100].

A DA é causada por níveis reduzidos de acetilcolina no cérebro, principalmente de pessoas idosas. A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor relacionado aos processos cognitivos, motores e da memória, e quando seus níveis são reduzidos, a medida que a doença progride, todas essas funções são prejudicadas [97, 101].

A forma mais promissora para o tratamento da DA é o aumento dos níveis do neurotransmissor acetilcolina no cérebro dos pacientes através do uso de inibidores das enzimas que o degradam, a acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), aumentando assim a capacidade da ACh de estimular os receptores cerebrais [98, 102, 103], sendo que no cérebro humano saudável a atividade da AChE predomina e a BChE desempenha um papel secundário na hidrólise (degradação) da ACh [104]. De fato, os fármacos mais efetivos para o tratamento da DA são aqueles que inibem a AChE [102].

Alguns fármacos já foram aprovados e são utilizados para o tratamento do Alzheimer como a tacrina (Cognex<sup>®</sup>, I), o donepezil (Aricept<sup>®</sup>, II), a rivastigmina (Exelon<sup>®</sup>, III) e a galantamina (Reminyl<sup>®</sup>, IV), devido a capacidade destes de inibir a AChE [100, 101].



No entanto, vários efeitos adversos foram relatados devido ao uso desses inibidores da AChE como hepatotoxicidade, distúrbios gastrointestinais, náuseas, enjoos, diarreia e tontura [105]. Deste modo, é de suma importância a descoberta e desenvolvimento de novos agentes anticolinesterásicos que sejam eficazes, acessíveis do ponto de vista financeiro e que apresentem menores (ou nenhum) efeitos colaterais [105, 106].

Segundo Araújo *et al.* [107], os métodos mais empregados para a avaliação da atividade de inibição da AChE são os colorimétricos, principalmente aqueles baseados no método de Ellman [108] (às vezes com algumas modificações) devido à sua praticidade, sensibilidade e reprodutibilidade. Esses métodos consistem na avaliação qualitativa e/ou quantitativa por técnicas espectrofotométricas da atividade de inibição enzimática apresentada por determinada amostra frente a AChE, verificada através do aparecimento de um determinado composto em solução, devido a ação enzimática, que pode ser monitorado por colorimetria em comprimento de onda específico [107].

Contudo, estratégias inovadoras que sejam rápidas e eficazes são continuamente requeridas para auxiliar na busca por preparações ou substâncias com atividade anticolinesterásica. Nesse sentido, o emprego de reatores enzimáticos com enzimas AChE imobilizadas na superfície interna de capilares de sílica fundida, ICER-AChEs (ICER - Immobilized Capillary Enzyme Reactor), acoplados a instrumentos de Cromatografia Líquida têm demonstrado resultados promissores com relação ao rastreio de substâncias ou preparações com potencial de inibição da AChE equivalentes àqueles obtidos com a enzima dispersa em solução como no método de Ellman [104, 108, 109, 110].

Diante da necessidade de obtenção de novas fontes terapêuticas para o tratamento da DA, os extratos obtidos de *Lippia alba* foram testados quanto à sua capacidade de inibição da enzima AChE, avaliada pelo monitoramento direto do produto da hidrólise enzimática da ACh, a colina, mediada pela AChE através da utilização de ICER-AChE conectado a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas [104, 107, 110].

## 1.5 Revisão da literatura

### 1.5.1 Gênero *Lippia* (Família: *Verbenaceae*)

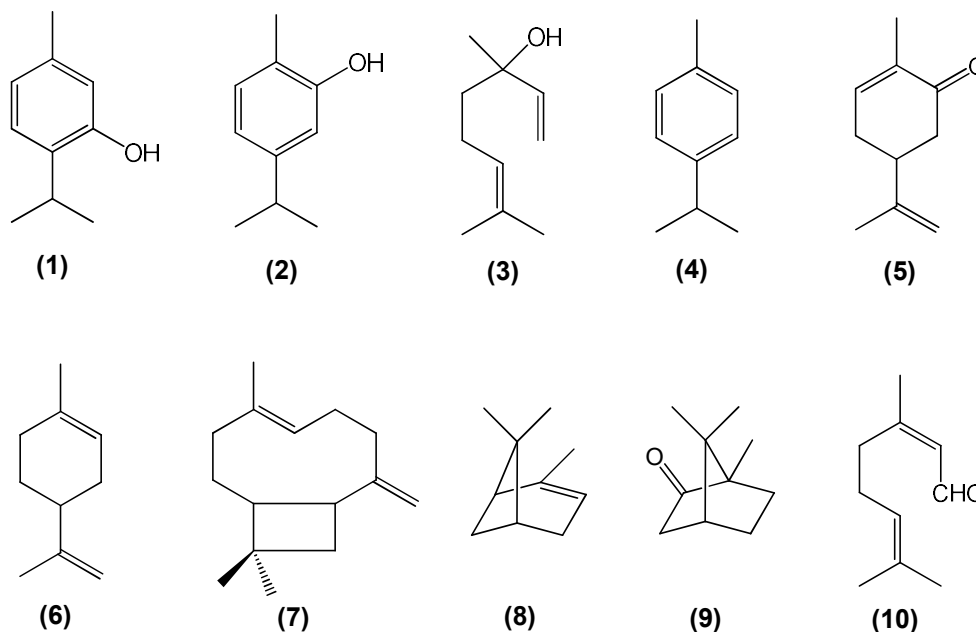
A família *Verbenaceae* é composta por cerca de 175 gêneros e 2.800 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais pelo mundo e em regiões temperadas do hemisfério sul, sendo que algumas espécies são, também, encontradas em regiões temperadas do hemisfério norte [4].

O gênero *Lippia* (*Verbenaceae*) inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e árvores pequenas. Estas plantas são distribuídas principalmente em toda a América Central, América do Sul e em regiões tropicais da África [82]. Na maioria das vezes, as espécies deste gênero são utilizadas como remédios para problemas gastrointestinais e respiratórios, sendo que algumas apresentaram, ainda, atividades antimaláricas, antivirais e citostáticas [111]. As principais partes usadas são as folhas, flores e caules, comumente preparadas nas formas de infusão ou decocção e administradas por via oral. As folhas de várias espécies desse gênero são, também, utilizadas como tempero durante a preparação de diversos tipos de alimentos [82, 111].

De forma geral, os membros do gênero *Lippia* apresentam similaridades em sua constituição química, atividades farmacológicas e usos populares. Este gênero é caracterizado pela presença de óleos essenciais, que são extraídos, principalmente, de suas folhas e caules, com potencial biológico como atividade antimicrobiana, que é relacionada a presença do timol e carvacrol [82, 112].

Estudos fitoquímicos realizados com as espécies que compõem o gênero *Lippia* referem-se principalmente aos seus constituintes voláteis [38]. Entre os constituintes químicos encontrados com maior frequência nos óleos essenciais de *Lippia* estão: timol (1), carvacrol (2), linalol (3), p-cimeno (4), carvona (5), limoneno (6),  $\beta$ -cariofileno (7),  $\alpha$ -pineno (8), cânfora (9) e citral (10) [87, 111]. Entretanto, substâncias como flavonóides, iridóides, fenilpropanóides/feniletanóides glicosilados e naftoquinonas têm sido relatados na literatura como constituintes não voláteis presentes neste gênero [38, 113, 114, 115, 116, 117].





Os flavonóides são referenciados na literatura como substâncias detentoras de importantes efeitos biológicos incluindo atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antidiabética, cardioprotetora, bem como atividade de inibição enzimática [118, 119]. Algumas naftoquinonas são descritas como bactericidas e fungicidas enquanto outras apresentam atividades antiprotozoárias e antivirais. Aos iridóides são atribuídas diversas propriedades biológicas, tais como: antiviral, antimicrobiana, antitumoral, vasoconstritora, hepatoprotetora e anti-inflamatória [38].

Com base no extenso uso terapêutico de diversas plantas medicinais na medicina popular muitos estudos se concentraram nos perfis fitoquímicos destas plantas para tentar correlacionar a composição química e as propriedades farmacológicas evidenciadas nos seus extratos vegetais, frações purificadas ou nos seus constituintes isoladamente [82].

Nesse sentido, diversos estudos realizados com relação aos óleos essenciais e extratos obtidos de *Lippia* têm mostrado o imenso potencial biológico e econômico resultante da grande diversidade química das espécies desse gênero, validando muitas das indicações populares dessas plantas [87].

Melo *et al.* [82] desenvolveram um trabalho objetivando avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial obtido das folhas de diferentes genótipos de *L. gracilis* Schauer. Nesse trabalho, os autores observaram que os óleos essenciais obtidos de duas plantas diferentes desta espécie, uma com elevado teor de timol (1) e a outra de carvacrol (2), exibiram excelentes atividades antifúngicas frente ao fungo *Trichophyton rubrum* em concentrações inferiores às observadas na literatura e semelhantes às utilizadas para o antifúngico comercial Fluconazol. O *Trichophyton rubrum* é responsável por cerca de 60% das infecções de pele causadas por dermatófitos no Brasil [82].

Fernandes *et al.* [120] demonstraram em seus experimentos que o óleo essencial das folhas e os extratos etanólicos das raízes e folhas de *L. gracilis* Schauer apresentaram grande percentual de inibição, *in vitro*, do fungo *Monosporascus cannonballus* (causador da destruição em culturas de melão pelo mundo) semelhante ao controle positivo utilizado, o fungicida comercial Captan. A ação fungicida do óleo essencial de *L. gracilis* foi, supostamente, atribuída aos seus componentes majoritários, o timol (1) e o carvacrol (2), enquanto que saponinas, existentes no extrato etanólico desta planta, podem ser as principais responsáveis pela atividade antifúngica apresentada por esse extrato, conforme afirmam os autores.

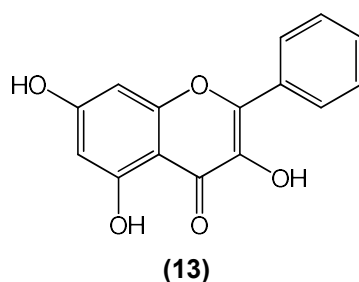
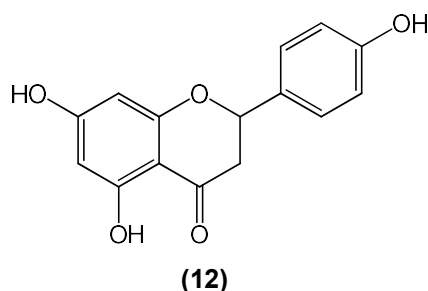
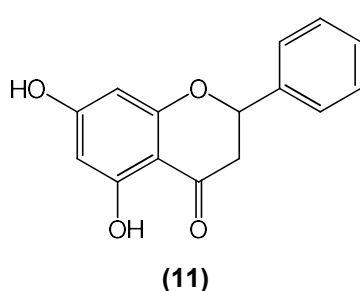
Estudos como estes, contribuem para o desenvolvimento de novos produtos químicos de origem vegetal menos danosos ao meio ambiente e que possam ser comercializados para o controle de fungos fitopatogênicos como o *Monosporascus cannonballus* [120].

Em um trabalho realizado por Pérez *et al.* [121], foi observado que o extrato etanólico das folhas de *L. dulcis* apresentou atividade anti-inflamatória significativa em edemas (inflamações) induzidos em ratos. Tal fato justifica, em parte, o uso tradicional desta espécie na medicina popular mexicana como anti-inflamatória.

Em estudo feito por Trevisan *et al.* [122], na busca por espécies de plantas que possuísem efeitos anticolinesterásicos e que, portanto, possam vir a ser utilizadas para o tratamento da doença de Alzheimer, foi observado que o extrato bruto de *L. sidoides* apresentou importante efeito de inibição da enzima

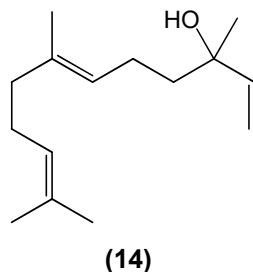
AChE. No entanto, segundo os autores, estudos adicionais são necessários para se avaliar com mais detalhes o potencial anticolinesterásico desta espécie.

No trabalho desenvolvido por Bores *et al.* [123] foi observado que o extrato metanólico das folhas de *L. graveolens* H.B.K apresentou importantes efeitos fotoprotetores em camundongos (tratados por via tópica com este extrato) expostos a radiação Ultravioleta B (UVB) por um determinado período de estudo, prevenindo o surgimento de tumores nestes animais. Segundo os autores, esta proteção fotoquímica do extrato foi supostamente atribuída a presença de compostos tais como pinocembrina (**11**), naringenina (**12**) e galangina (**13**), para as quais foram atribuídas atividades antineoplásicas; sugerindo seu potencial como aditivo em produtos relacionados aos cuidados da pele como cremes e protetores solares.



Gomide *et al.* [85] mostraram em seus experimentos que os óleos essenciais das espécies *L. sidoides* Cham. e *L. salviifolia* Cham. apresentaram significativas atividades citotóxicas frente a linhagens de células tumorais do cólon de rato (CT26.TW). Estes resultados foram atribuídos aos componentes majoritários presentes nas espécies, sendo que o timol (**1**) foi predominante em *L. sidoides* e o nerolidol (**14**) em *L. salviifolia*. Assim, este trabalho estimula

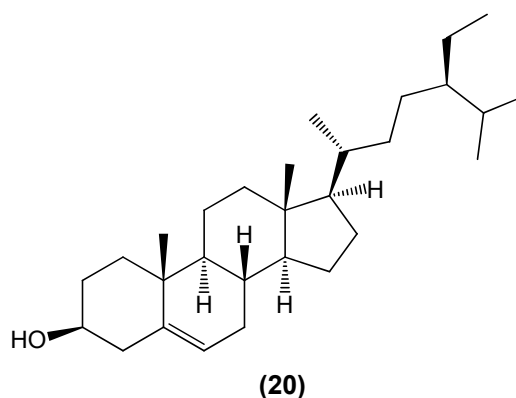
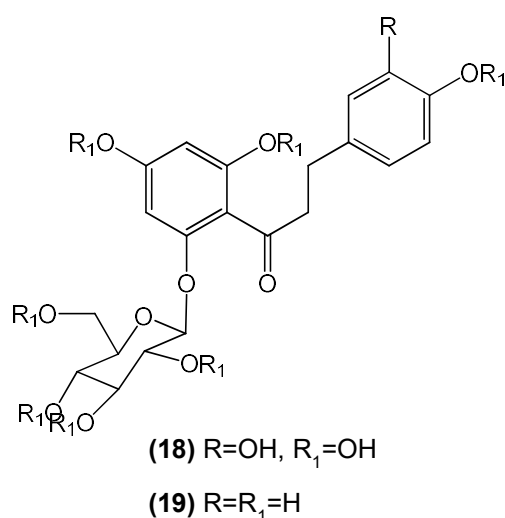
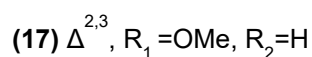
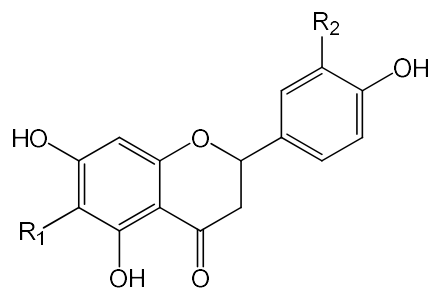
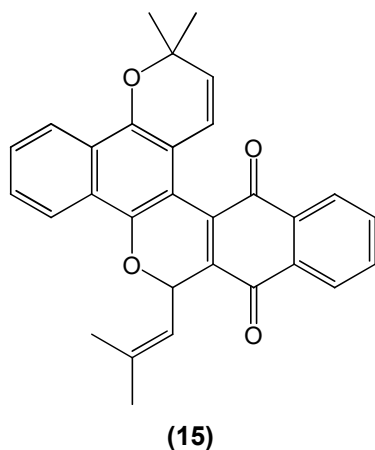
novos estudos com espécies do referente gênero na busca de uma estratégia alternativa para o tratamento do câncer.



A espécie *L. sidoides*, principalmente encontrada nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, tem seu uso comprovado na medicina popular, especialmente como antisséptico e antimicrobiano. Seu óleo essencial é rico em timol (**1**) e carvacrol (**2**), que apresentam comprovadas atividades antisséptica, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória e larvívica; apresentando alto valor comercial. Por estes motivos esta espécie foi uma das plantas selecionadas pelo SUS para a produção de fitoterápicos no Brasil [114, 124].

A comprovação, através de estudos científicos, das ações farmacológicas para muitas espécies do gênero *Lippia*, provavelmente motivou estudos químicos visando o isolamento e identificação de compostos que possam ser os responsáveis por tais atividades [125].

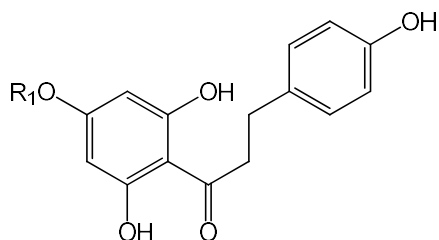
Almeida *et al.* [124] isolaram e identificaram dos extratos etanólicos dos talos, das raízes e das folhas da espécie *L. sidoides*, a naringenina (**12**), a naftoquinona tecomaquinona (**15**), a mistura de flavonoides 3',4',5,7-tetra-hidroxiflavanona (**16**) e 4',5,7-tri-hidroxi-6-metoxiflavona (**17**), e a mistura de di-hidrochalconas 2'-O-β-D-glicopiranosil-3,4,4',6'-tetra-hidroxi-di-hidrochalcona (**18**) e 2'-O-β-D-glicopiranosil-4,4',6'-tri-hidroxi-di-hidrochalcona (**19**), além do β-sitosterol (**20**) e do carvacrol (**2**).



Neste trabalho, ensaios de atividade antioxidante foram realizados com o extrato etanólico das folhas e com seus compostos isolados empregando-se o método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) [124]. Segundo os autores, tanto o extrato etanólico quanto os flavonóides e outros constituintes isolados dessa espécie apresentaram significativa atividade antioxidante semelhante a dos padrões testados (vitamina C e Trolox).

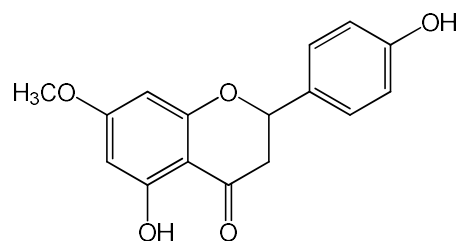
Funari *et al.* [126] isolaram do extrato etanólico das folhas de *L. salviaefolia* Cham. os compostos asebogenina (**21**), floretina (**22**), sakuranetina (**23**), naringenina (**12**), eridictiol 7-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (**24**), aromadendrina (**25**), e dois fenilpropanóides/feniletanóides glicosilados: forsitosídeo B (**26**) e verbascosídeo (**27**). Segundo o autor, os flavonóides floretina (**22**) e aromadendrina (**25**), das folhas de *L. salviaefolia*, foram capazes de proteger as células normais de rim humano (HEK-293) contra o estresse oxidativo

induzido pelo oxidante *t*-butilhidroperóxido, sugerindo o grande potencial antioxidante destes compostos. Além disso, a floretina (**22**) apresentou atividade antineoplásica, causando morte celular em linhagens de células de melanoma humano M14 (células tumorais).

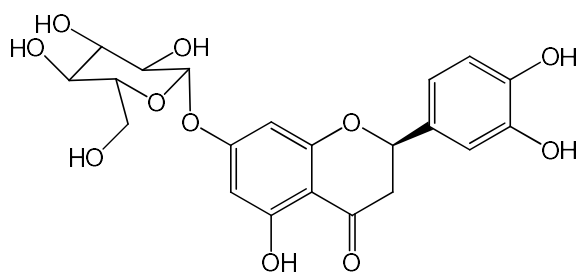


(21)  $R_1 = \text{CH}_3$

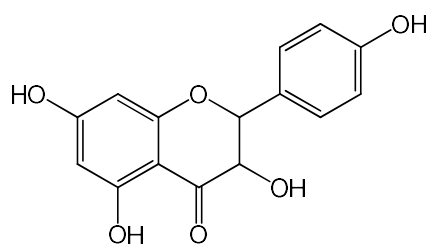
(22)  $R_1 = \text{H}$



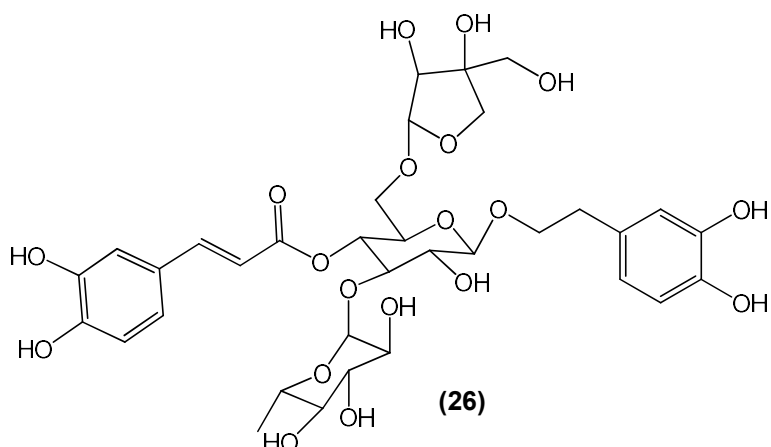
(23)



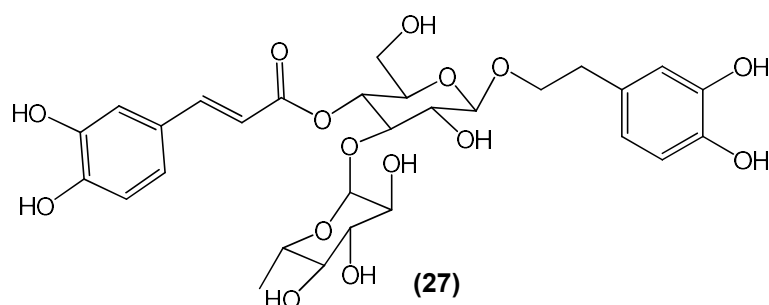
(24)



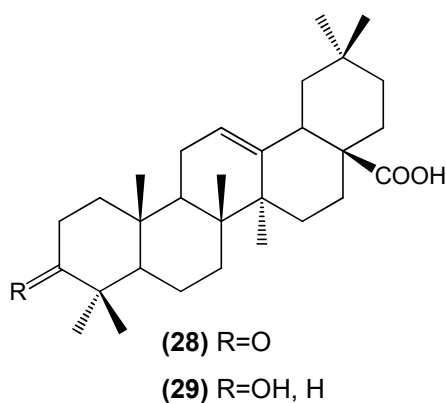
(25)



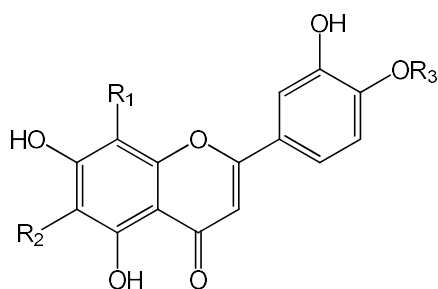
(26)



O triterpeno ácido oleanônico (**28**), isolado do extrato etanólico da raiz de *L. lupulina* por Funari *et al.* [127], apresentou atividade leishmanicida contra o protozoário *Leishmania amazonenses* semelhante àquela da Pentamidina, uma das substâncias mais utilizadas para esse fim, e maior atividade tripanocida frente ao *Trypanosoma cruzi* do que o benzonidazol, único agente terapêutico para a doença de Chagas até então em uso. O ácido oleanólico (**29**) também foi relatado neste trabalho como um metabólito encontrado nesta espécie, mas ele não apresentou resultado considerável com relação aos testes realizados.



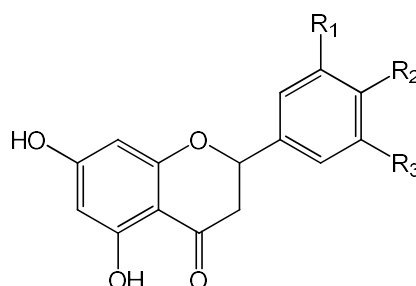
Em um trabalho desenvolvido por Moraes *et al.* [81] foram isolados e identificados do extrato aquoso de *L. gracilis* Schauer sete compostos: carvacrol (**2**), naringenina (**12**), orientina (**30**), isoorientina (**31**), luteolina 4'-O- $\beta$ -glicopiranosídeo luteolina (**32**), 5,7,3',5'-tetrahidroxiflavanona (**33**) e o carvacrol 2-O- $\beta$ -glicopiranosídeo (**34**). Cinco destes compostos, até então, nunca haviam sido relatados no gênero *Lippia* (compostos **30** a **34**).



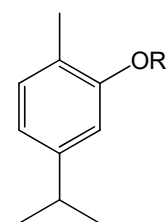
**(30)**  $R_1 = \text{Glucose}$ ,  $R_2 = R_3 = \text{H}$

**(31)**  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{Glucose}$ ,  $R_3 = \text{H}$

**(32)**  $R_1 = R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{Glucose}$

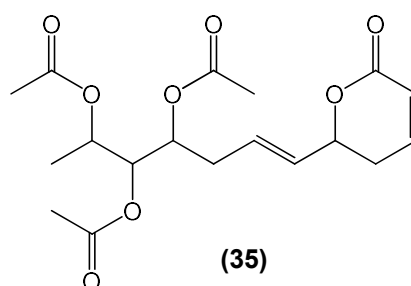


**(33)**  $R_1 = R_3 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{H}$



**(34)**  $R = \text{Glucose}$

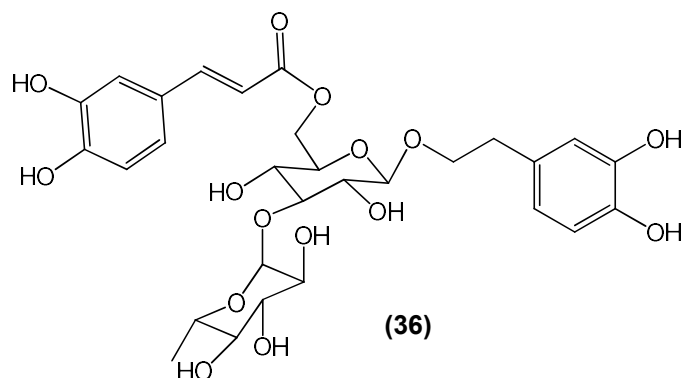
Ludere *et al.* [128] realizaram uma separação cromatográfica do extrato de acetato de etila obtido a partir das folhas de *L. javanica* e isolaram uma  $\alpha$ -pirona, a lippialactona (**35**), a qual apresentou grande potencial antimalárico com relação ao protozoário *Plasmodium falciparum* (causador da malária em humanos). No entanto, esta substância apresentou atividade muito menor do que a Cloroquinina, o controle positivo utilizado, que é um potente remediador deste parasita.



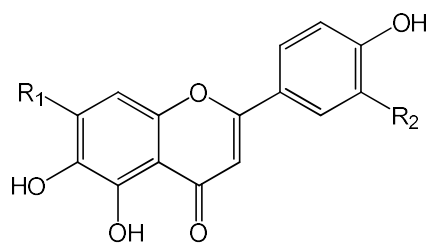
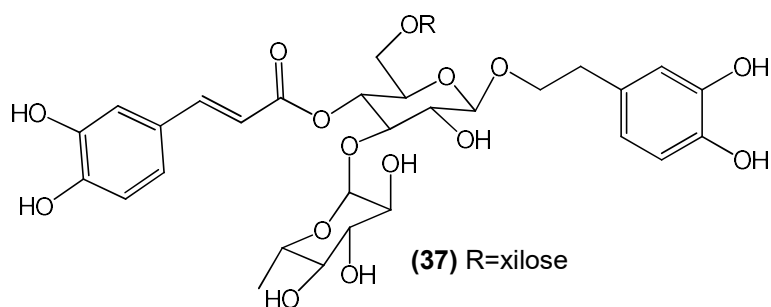
**(35)**

Olivier *et al.* [113] isolaram e identificaram do extrato metanólico das partes aéreas de *L. javanica* os fenilpropanóides glicosilados verbascosídeo (**27**) e isoverbascosídeo (**36**).





De uma fração obtida do extrato metanólico de *Lippia nodiflora* foram isolados e identificados, por Cheng *et al.* [129], dois fenilpropanóides glicosilados: verbascosídeo (**27**) e arenariosídeo (**37**), e três flavonóides: 6-hidroxiluteolina (**38**), 6-hidroxiluteolina-7-O-glicosídeo (**39**) e nodifloreтина (**40**).



**(38)**  $R_1=OH$ ,  $R_2=OH$

**(39)**  $R_1=O\text{-Glicose}$ ,  $R_2=OH$

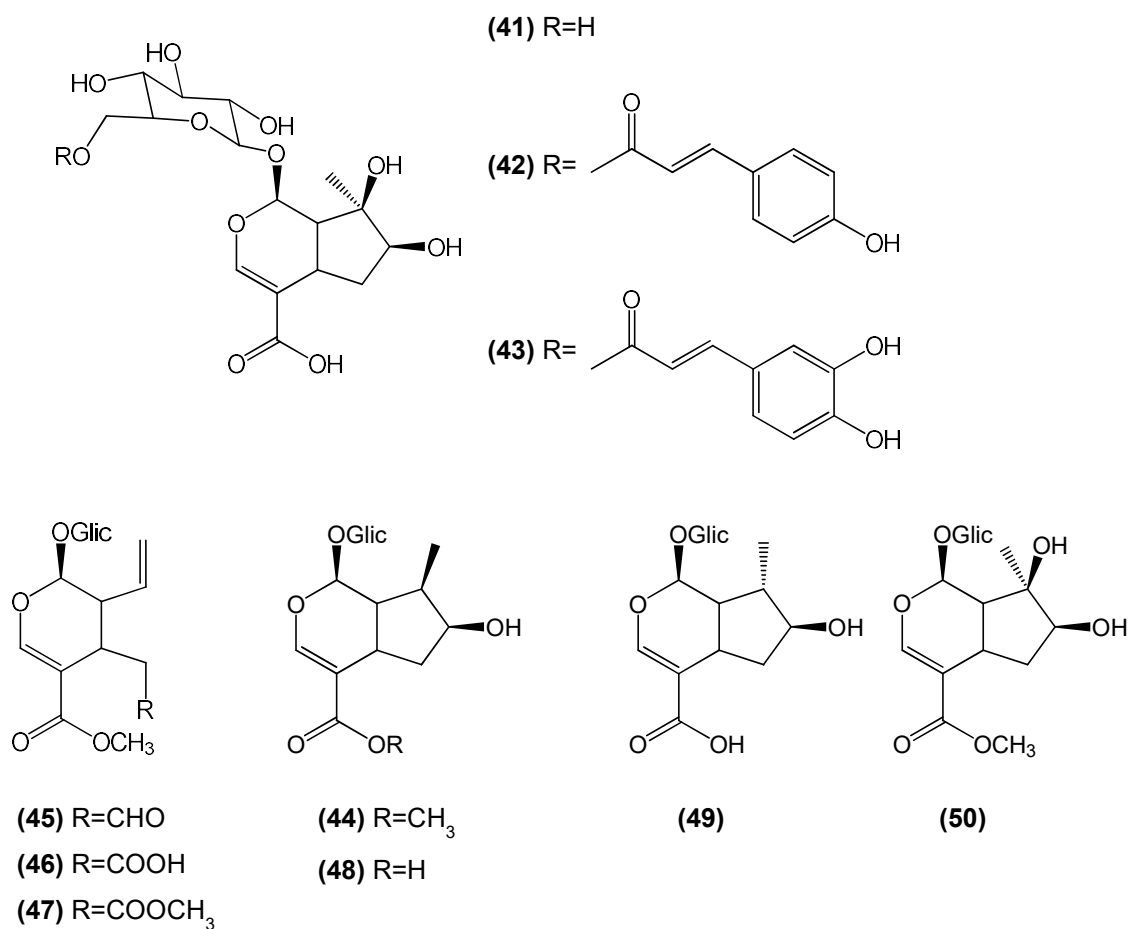
**(40)**  $R_1=OH$ ,  $R_2=OCH_3$

Cheng *et al.* [129] investigaram a inibição enzimática *in vivo* de uma fração do extrato metanólico de *Lippia nodiflora*, constituída pelos compostos **27**, **37**, **38**, **39** e **40**, bem como dos seus compostos isolados separadamente,

frente as enzimas xantina desidrogenase (XDH) e xantina oxidase (XOD) presentes no fígado de ratos submetidos ao estado de hiperuricemia induzida. Nestes experimentos, os autores evidenciaram que a fração estudada apresentou melhores resultados de inibição enzimática em comparação com o extrato bruto. Por outro lado, essa fração foi menos ativa do que os flavonóides **38**, **39** e **40**, que mostraram potencial de inibição enzimática comparável ao controle positivo utilizado (Alopurinol) na mesma concentração testada, com destaque para o 6-hidroxiluteolina-7-O-glicosídeo (**39**), o melhor dos três flavonóides para esse propósito. A partir destes resultados, pôde-se supor que a atividade antihiperuricêmica desta espécie está principalmente relacionada aos flavonóides presentes em sua constituição química.

As enzimas XDH e XOD têm um papel fundamental no catabolismo de purina até formar o ácido úrico presente em diversas espécies de animais. Um excesso destas enzimas no organismo pode levar a hiperuricemia que, de forma geral, corresponde ao excesso de ácido úrico no organismo. A hiperuricemia está associada a doenças como a diabetes, gota, doença renal crônica, hipertensão, obesidade, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral, chegando a afetar cerca de 43,3 milhões de pessoas nos Estados Unidos entre os anos de 2007 e 2008 [129].

Os Iridóides representam outra classe de compostos frequentemente encontrados em várias espécies de *Lippia*. Diversos iridóides foram isolados e identificados a partir do extrato metanólico das folhas de *L. graveolens* H.B.K.: ácido carioptosídico (**41**), lippiosídeo I (**42**), lippiosídeo II (**43**), loganina (**44**), secologanina (**45**), secoxiloganina (**46**), dimetilsecologanosídeo (**47**), ácido logânico (**48**), ácido 8-*epi*-logânico (**49**) e carioptosídeo (**50**) [130].



Considerando os trabalhos citados nesta revisão, foi possível observar a grande diversidade química das espécies do gênero *Lippia* e constatar a importância que as pesquisas multidisciplinares voltadas para este gênero representam, fornecendo uma estratégia para a descoberta de preparações ou substâncias de grande potencial farmacológico e/ou econômico.

### 1.5.2 *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown

A espécie *Lippia alba* é um subarbusto de morfologia variável, podendo atingir até um metro e meio de altura, sendo nativa de quase todo o território brasileiro. Possui ramos finos e esbranquiçados, arqueados, longos e quebradiços. As folhas são inteiras, de bordos serrados e ápice agudo, de 3-6 cm de comprimento. As suas flores são azul-arroxeadas, reunidas em inflorescências axilares capituliformes de eixo curto e tamanho variável,

enquanto os frutos são drupas globosas de cor róseo-arroxeadas (Figura 1) [131].

**Figura 1:** Fotografias da espécie *L. alba*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A *L. alba* é popularmente conhecida por diversos nomes, incluindo erva-cidreira, erva-cidreira-de-arbusto, alecrim-selvagem, falsa-melissa, erva-cidreira-brasileira e alecrim-do-campo [3]. Essa planta é utilizada tradicionalmente devido às suas propriedades medicinais, tais como analgésica, anti-inflamatória, antipirética, sedativa, tranquilizante, antiespasmódica, expectorante, e, ainda, como remédio para perturbações gastrointestinais [111].

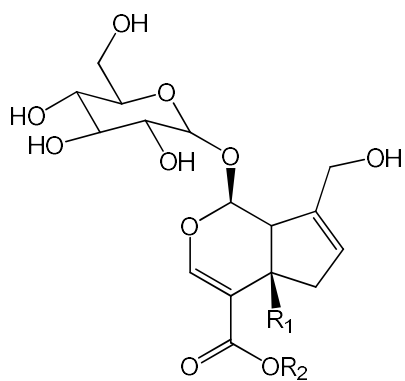
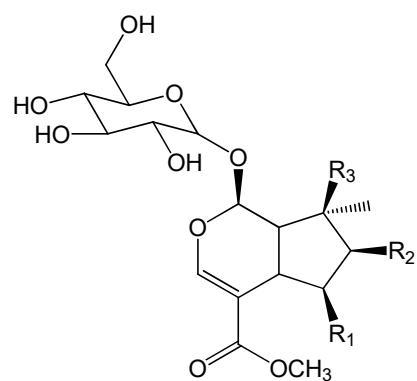
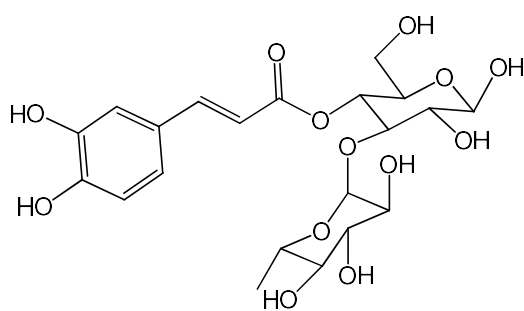
As partes mais utilizadas desta espécie são as suas folhas e caules, preparados na forma de chás (infusão ou decocção), macerada, em compressas, banhos ou extratos alcoólicos por causa de suas propriedades farmacológicas atribuídas aos seus constituintes ativos, entre eles os compostos presentes em seu óleo essencial. Em muitos casos, suas folhas são utilizadas no preparo de diversos tipos de alimentos [3].

Entre os principais representantes do gênero *Lippia*, a *L. alba* destaca-se por seu potencial farmacológico que está relacionado à grande variabilidade química dos seus óleos essenciais. Essa variabilidade permite classificar as

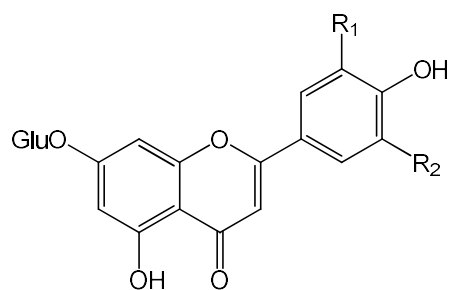
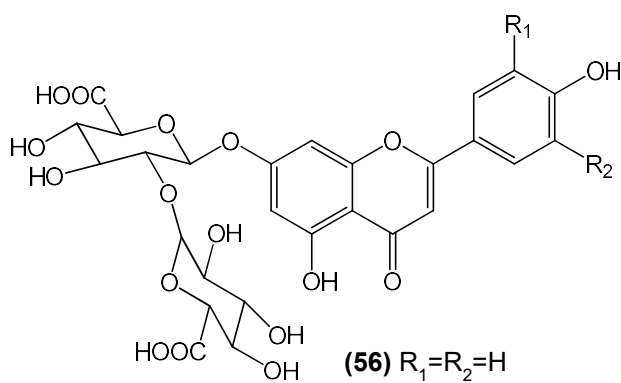
espécies de *L. alba* como diferentes quimiotipos de acordo com os componentes majoritários dos seus óleos essenciais como, por exemplo: o quimiotipo “carvona”, rico em carvona (**5**), ou o quimiotipo carvona-limoneno (**5-6**), referente a mistura destes compostos [4, 132].

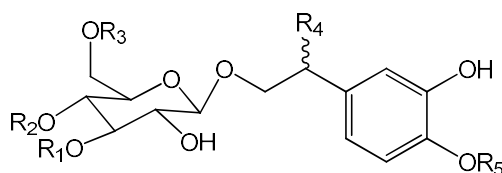
O linalol (**3**), encontrado no óleo essencial desta espécie, tem se destacado pelo seu expressivo rendimento na planta e utilização nas indústrias de aromatizantes, cosméticos e perfumes [133]. A carvona (**5**) apresenta atividades antimicrobiana e antifúngica comprovadas biologicamente, sendo muito utilizada nas indústrias de alimentos e fármacos. O limoneno (**6**) é utilizado em produtos de limpeza, nas indústrias do gênero alimentício e de cosméticos, enquanto o citral (**10**), relatado também nesta espécie, é utilizado nas indústrias de perfumes, alimentos e cosméticos, sendo responsável pelo característico aroma de limão destes produtos [4, 5].

Entre os constituintes não voláteis comumente encontrados em *L. alba* estão: flavonóides, fenilpropanóides glicosilados e iridóides [115, 117]. Diversos compostos foram identificados por Timóteo *et al.* [115] a partir do extrato aquoso preparado por decocção das folhas desta espécie: tevesídeo (**51**), 8-*epi*-loganina (**52**), ácido geniposídico (**53**), mussaenosídeo (**54**); cistanosídeo (**55**), apigenina-7-*O*-diglicuronídeo (**56**), crisoeriol-7-*O*-diglicuronídeo (**57**), tricina-7-*O*-diglicuronídeo (**58**), luteolina-7-*O*-glicuronídeo (**59**) e tricina-7-*O*-glicuronídeo (**60**); forsitosídeo B (**26**), verbascosídeo (acteosídeo) (**27**), isoverbascosídeo (isoacteosídeo) (**36**),  $\beta$ -OH-acteosídeo (**61a**, **61b**, diastereoisômeros), calceolariosídeo E (ou isonuomiosídeo) (**62**), leucosceptosídeo A (**63**) e martinosídeo (**64**).

(51)  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ (53)  $R_1=R_2=H$ (52)  $R_1=H$ ,  $R_2=OH$ ,  $R_3=H$ (54)  $R_1=R_2=H$ ,  $R_3=OH$ 

(55)

(59)  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ (60)  $R_1=R_2=OCH_3$ (56)  $R_1=R_2=H$ (57)  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ (58)  $R_1=R_2=OCH_3$



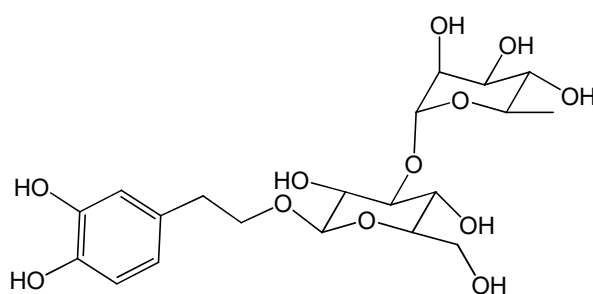
**(61a, 61b)**  $R_1 = \alpha\text{-L-ramnose}$ ,  $R_2 = (E)\text{-caffeoil}$ ,  $R_3 = \text{H}$ ,  $R_4 = \text{OH}$ ,  $R_5 = \text{H}$

**(62)**  $R_1 = \beta\text{-apiose}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = (E)\text{-caffeoil}$ ,  $R_4 = \text{H}$ ,  $R_5 = \text{H}$

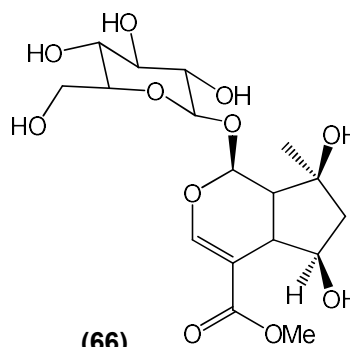
**(63)**  $R_1 = \alpha\text{-L-ramnose}$ ,  $R_2 = (E)\text{-feruloil}$ ,  $R_3 = \text{H}$ ,  $R_4 = \text{H}$ ,  $R_5 = \text{H}$

**(64)**  $R_1 = \alpha\text{-L-ramnose}$ ,  $R_2 = (E)\text{-feruloil}$ ,  $R_3 = \text{H}$ ,  $R_4 = \text{H}$ ,  $R_5 = \text{CH}_3$

Barbosa *et al.* [134] isolaram três compostos a partir da decocção resultante da hidrodestilação das folhas de *L. alba*: isonuomiosídeo (**62**); decafeoilverbascosídeo (**65**) e o éster metílico shanzhisídeo (**66**).

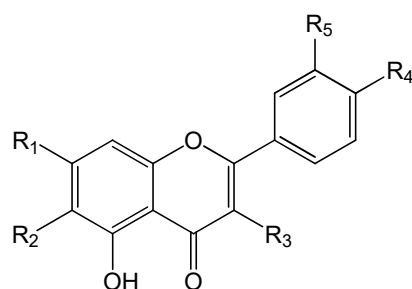


**(65)**



**(66)**

Trevisan *et al.* [117] identificaram do extrato etanólico das folhas de *L. alba* o verbascosídeo (**27**), o isoverbascosídeo (**36**) e o calceolariosídeo E (**62**), já encontrados em outras espécies deste gênero. Além disso, os autores relataram a presença de diversos flavonóides: naringenina (**12**); luteolina (**67**); spinacetin (**68**); apigenina (**69**); hispudulina (**70**); 5,7,3'-trihidroxi-3,6,4'-trimetoxiflavona (**71**); 5,7,4'-trihidroxi-3,6-dimetoxiflavona (**72**); santina (**73**) e pectolinarigenina (**74**).



(67)  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=H$ ,  $R_4=OH$ ,  $R_5=OH$

(68)  $R_1=OH$ ,  $R_2=OCH_3$ ,  $R_3=OCH_3$ ,  $R_4=OH$ ,  $R_5=OH$

(69)  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=H$ ,  $R_4=OH$ ,  $R_5=H$

(70)  $R_1=OH$ ,  $R_2=OCH_3$ ,  $R_3=H$ ,  $R_4=OH$ ,  $R_5=H$

(71)  $R_1=OH$ ,  $R_2=OCH_3$ ,  $R_3=OCH_3$ ,  $R_4=OCH_3$ ,  $R_5=OH$

(72)  $R_1=OH$ ,  $R_2=OCH_3$ ,  $R_3=OCH_3$ ,  $R_4=OH$ ,  $R_5=H$

(73)  $R_1=OH$ ,  $R_2=OCH_3$ ,  $R_3=OCH_3$ ,  $R_4=OCH_3$ ,  $R_5=H$

(74)  $R_1=OH$ ,  $R_2=OCH_3$ ,  $R_3=H$ ,  $R_4=OCH_3$ ,  $R_5=H$

Diversas atividades biológicas em potenciais dos óleos essenciais e extratos de *L. alba* têm sido relatadas na literatura, tais como antifúngica, acaricida, sedativa, antiespasmódica, antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória [5, 111, 125, 131, 133, 135]. Porém, a maioria destes estudos estão relacionados aos óleos essenciais desta espécie.

Em um trabalho desenvolvido por Timóteo *et al.* [115] foi possível observar o potencial antioxidante dos extratos aquosos preparados por infusão e decocção a partir das folhas de *L. alba*. As atividades antioxidantes observadas, segundo os autores, podem ser atribuídas principalmente aos diversos flavonóides e fenilpropanóides existentes nestes extratos.

Até o momento, poucos trabalhos têm relatado o efeito citotóxico e anticolinesterásico dos extratos preparados a partir da *L. alba* frente a células tumorais e a enzima AChE, respectivamente, especialmente com relação a uma das formas de preparação mais utilizadas tradicionalmente, a infusão. Desta forma, neste trabalho, objetivou-se avaliar o potencial antitumoral e anticolinesterásico das infusões e macerações (hidroalcoólicas) obtidas de diferentes acessos de *L. alba*, visto que algumas espécies deste gênero têm apresentado resultados promissores frente a células cancerígenas [75], bem como ação anticolinesterásica [103, 122].



### 1.5.3 *Fingerprints cromatográficos e Análise de Componentes Principais (PCA)*

Estudos prévios mostraram que *fingerprints* cromatográficos de extratos metanólicos de genótipos de *L. gracilis* obtidos por CLAE-DAD, quando combinados com análises quimiométricas (PCA), permitiram a classificação e o agrupamento de plantas de acordo com seu local de origem, evidenciando uma das potencialidades desta metodologia [60].

Prado *et al.* [15] desenvolveram um *fingerprint* cromatográfico por CLAE-DAD para a diferenciação de genótipos de *L. gracilis* a partir do extrato aquoso das suas folhas preparadas na forma de infusão. Neste estudo, foi possível observar o efeito da sazonalidade sobre a composição química desta espécie, bem como as diferenças existentes entre seus genótipos pela aplicação da PCA aos dados cromatográficos obtidos.

Yang *et al.* [136] usaram *fingerprints* cromatográficos, obtidos por CLAE-UV juntamente com a PCA, para a identificação de adulteração em amostras de cacau em pó, baseando-se em seu perfil de polissacarídeo. Neste trabalho, pôde-se observar a potencialidade da metodologia desenvolvida, a qual se mostrou eficiente na diferenciação entre as amostras de cacau verdadeiras e adulteradas propositalmente com diversos materiais como cascas de amendoim e amido de milho.

Estudos para avaliar as diferenças e semelhanças entre espécies de *Pyrrosia* (*Pyrrosia sheareri*, *Pyrrosia lingua* Farwell e *Pyrrosia petiolosa*), de diferentes províncias da China, foram realizados por CUI *et al.* [17] fazendo-se uso de *fingerprints* cromatográficos (“HPLC-DAD”) com o auxílio da PCA. Neste trabalho os autores conseguiram distinguir as espécies de acordo com os locais de origem, além de fornecer uma metodologia promissora para o controle de qualidade destas espécies.

Zhou *et al.* [137] desenvolveram uma metodologia por *fingerprints* cromatográficos por HPLC-DAD combinada com PCA para diferenciar sementes processadas daquelas não processadas obtidas da espécie *Descurainia sophia* (L.). As sementes dessa planta são utilizadas na China com

finalidades terapêuticas distintas a depender da sua condição (processada ou não processada), sendo importante a discriminação entre as duas formas desse material.

A metodologia por *fingerprints* cromatográficos (HPLC-DAD) combinada com a PCA foi capaz de demonstrar as diferenças químicas entre as amostras de *Ocimum basilicum* (manjerição) cultivadas de forma orgânica (utilizando-se esterco animal, por exemplo) daquelas convencionais. Além disso, foi possível observar quais compostos foram os principais responsáveis por essa diferenciação [138]. As condições de cultivo, entre elas o tipo de nutrientes presentes no solo, podem afetar o conteúdo de metabólitos secundários de uma planta, e, conseqüentemente, afetar seu potencial terapêutico. Dessa forma torna-se importante avaliar as diferenças existentes entre plantas cultivadas de forma diferente, tanto do ponto de vista químico quanto farmacológico [9].

Diante do exposto, a estratégia por *fingerprints* cromatográficos em combinação com a PCA mostra-se de grande importância no que se refere a autenticação e controle de qualidade de preparações a base de plantas medicinais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Desenvolver um *fingerprint* cromatográfico por CL-DAD para a diferenciação química de acessos de *Lippia alba* com o auxílio de ferramentas quimiométricas e avaliar seu potencial antitumoral e anticolinesterásico.

## 2.2 Específicos

- Avaliar a influência da sazonalidade e do método de extração na composição química dos extratos obtidos das folhas de *L. alba* por meio de CL-DAD combinada com a PCA;
- Verificar o efeito da sazonalidade e da forma de extração nas atividades biológicas, antitumoral e anticolinesterásica, dos extratos obtidos de *L. alba*;
- Isolar e identificar os compostos químicos majoritários presentes no extrato desta espécie;
- Estabelecer um método para o controle químico de qualidade para a espécie *L. alba*.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Materiais e equipamentos

- Estufa de circulação forçada - modelo Marconi ML35;
- Balança analítica - modelo APX-200 da marca Denver Instrument Company;
- Microondas da marca Electrolux - modelo ME28S;
- Freezer da marca Electrolux - modelo FFE24;
- Ultrafreezer da marca Liotop - modelo UFR30;
- Liofilizador da marca Liotop - modelo L101;
- Evaporador rotatório da marca BUCHI (modelo R-3), acoplado a uma bomba de vácuo da mesma marca (modelo V-700); com um sistema de refrigeração da marca Microquímica Equipamentos Ltda (modelo MQBTC99-20);
- Centrifuga da marca Eppendorf - modelo minispin-plus;

- Banho de ultrassom da marca Unique - modelo Ultracleaner1600A;
- Leitora de microplacas SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA);
- Hoechst (Mycoplasma Stain Kit, Cat. MYC1, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA);
- Doxorrubicina (pureza  $\geq 95\%$ , cloridrato de doxorrubicina, Laboratório IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina);
- Alamar Blue (resazurina, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA);
- Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA);
- Enzimas AChE de peixe elétrico, Tipo V-S (Sigma-Aldrich, C2888);
- Ácido fórmico 88% (v/v) (JT. Baker, Philipsburg, PA, EUA);
- Metanol grau HPLC (JT. Baker, Philipsburg, PA, EUA);
- Acetonitrila grau HPLC (Tedia, Fairfield, OH, EUA);
- Etanol grau HPLC (PanReac, Espanha);
- Água deionizada (Milli-Q, modelo Gradient, Millipore, São Paulo, SP, Brasil);
- Metanol deuterado (99,8% de Deutério, Acros Organics);
- Acetonitrila deuterada (99,8% de Deutério, Acros Organics).

### **3.2 Sistemas cromatográficos**

- Cromatógrafo líquido da marca Shimadzu (Quioto, Japão) modelo Prominence composto por: módulo de comunicação CBM-20A; degaseificador DGU-20A3R; sistema binário de bombas LC-6AD; injetor automático SIL-20A; detector espectrofotométrico UV-VIS de

comprimento de onda variável SPD-20A. Forno de colunas da marca Younglin Instrumentos (**Sistema Semi-preparativo**);

- Cromatógrafo líquido da marca Shimadzu (Quioto, Japão) modelo Prominence composto por: módulo de comunicação CBM-20A, degaseificador DGU-20A3, sistema binário de bombas LC-20AT, injetor automático SIL-20AHT, detector espectrofotométrico com arranjo de diodos SPD-M20A, forno de colunas CTO-20A (**Sistema Analítico**);
- Cromatógrafo líquido da marca Agilent 1200 series (GMBH) equipado com degaseificador Agilent G1322A, sistema quaternário de bombas Agilent G1311A, injetor automático Bruker G1329A, detector espectrofotométrico com arranjo de diodos Agilent G1315D, bomba Knauer Bruker K120 pump control, unidade trocadora de cartuchos automática Prospekt 3 Bruker (versão 2.21.0.0) com micro cartuchos de SPE (HySphere Resin GP: 10 mm x 2 mm, 10 µm) com diversas fases estacionárias e forno de coluna Shimadzu CTO-10AS VP (**Sistema Agilent**);
- Cromatógrafo líquido Nexera XR equipado com degaseificador de membrana modelo DGU-20A3R, com duas bombas de alta pressão modelo LC-20ADXR e LC-20AD, injetor automático SIL-20A, detector espectrofotométrico com arranjo de diodos SPD-M20A, câmara de mistura MR180µLII (volume interno de 180 µL), forno de colunas modelo CTO-20A, com uma interface Shimadzu CBM-20A. O equipamento está acoplado a um espectrômetro de massas Bruker modelo AmaZon Speed com fonte tipo Electrospray Ion Source (ESI), duplo funil de íons e analisador do tipo Ion Trap controlado pelo software Compass 1.7 (**Sistema Nexera XR**).

### 3.3 Colunas cromatográficas e capilares

- Colunas cromatográficas: Luna C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex); Kinetex hexil-fenil (150 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex) e Kinetex C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex), acopladas a uma coluna de guarda de fase estacionária C<sub>18</sub>;
- Capilar de sílica fundida (300 x 0,375 mm x 100 µm di), tendo a enzima AChE imobilizada covalentemente em sua superfície interna.

### 3.4 Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear

- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de 600 MHz na frequência do hidrogênio (14,1 Tesla) da Bruker modelo UltraShield Plus 600, equipado com crioplatforma (cryofit), sonda criogênica com módulo ATMA (Automatic Tunning Matching) de 5 mm e gradiente em Z (CPTCI 1H-13C/15N/D Z-GRD) e unidade de controle de temperatura variável BVT 3000 (BCU 05).

### 3.5 Coleta das folhas e preparo dos extratos de *Lippia alba*

As folhas dos seis acessos de *L. alba*, codificadas como LA01, LA02, LA24, LA32, LA39 e LA54, foram coletadas em 14 de março de 2016 (verão) e em 20 de setembro de 2016 (inverno) na Fazenda Experimental “Campus Rural da UFS”, onde foram cultivados. Este material pertence ao Banco Ativo de Germoplasma, da Universidade Federal de Sergipe (UFS), que tem a supervisão do Prof. Dr. Arie Fitzgerald Blank do Laboratório de Culturas de Tecidos Vegetais e Melhoramento Vegetal, do Departamento de Engenharia Agrônômica (UFS). Exsicatas dos espécimens estão depositadas no Herbário

da UFS sob os códigos 14784, 14785, 13477, 13480, 13497 e 13478, para os acessos 01, 02, 24, 32, 39 e 54, respectivamente.

Após a coleta, as folhas foram secas em estufa de circulação forçada a 40 °C durante 5 dias e armazenadas em frascos de vidro (Figura 2).

**Figura 2:** Forma e local de armazenamento das folhas de *L. alba*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

De posse das folhas, foi iniciado o preparo das amostras. Os extratos aquosos foram preparados pelo método de infusão e os extratos hidroalcoólicos pelo método de maceração.

Para a preparação dos extratos aquosos, foram utilizadas 2 g de folhas para 200 mL de água. As folhas foram imersas em água quente (aproximadamente 92 °C, aquecida em micro-ondas) dentro de um béquer e deixadas em repouso a temperatura ambiente durante 10 minutos. Na sequência, cada preparação foi filtrada e levada ao ultrafreezer (temperatura de -79 °C) para posteriormente ser liofilizada (temperatura de -54 °C e pressão de 79 µmHg).

Para a preparação dos extratos hidroalcoólicos, foram pesadas 2 g de folhas para 100 mL de uma solução formada pela mistura de 50 mL de água e 50 mL de etanol. As folhas foram deixadas imersas nesta mistura por 24 horas. Posteriormente, cada preparação foi filtrada e o solvente orgânico evaporado (em evaporador rotatório). A solução aquosa restante foi levada ao ultrafreezer (temperatura de -79 °C) e posteriormente liofilizada (temperatura de -54 °C e pressão de 79 µmHg).

### 3.6 Preparo das amostras, condições cromatográficas de análise e análises quimiométricas

As análises cromatográficas para a obtenção dos perfis químicos (*fingerprint*) dos diferentes acessos de *L. alba* foram realizadas em dois cromatógrafos líquidos da marca Shimadzu (Quioto, Japão): **Sistema Semi-preparativo** e **Sistema Analítico** (Seção 3.2). O *software* LC Solution foi utilizado para a aquisição dos dados em ambos os sistemas.

Cada extrato foi analisado em quadruplicata, os quais foram preparados dissolvendo-se 5 mg, separadamente, em 1 mL de água ultrapura para os extratos aquosos; e em 1 mL de uma solução mistura ACN:H<sub>2</sub>O (40:60) para os extratos hidroalcoólicos. Na sequência, cada extrato solubilizado foi submetido à centrifugação em 13.300 rpm durante 5 min e transferido para os *vials* de análise. No total, foram realizadas 96 análises cromatográficas.

A melhor condição de separação cromatográfica foi conseguida no **Sistema Analítico** utilizando-se uma coluna analítica Kinetex C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex) acoplada a uma coluna de guarda de mesma fase estacionária, ambas a uma temperatura de 45 °C, com volume de injeção da amostra de 25 µL. A fase móvel utilizada foi constituída por uma mistura binária de acetonitrila (B) e uma solução aquosa de ácido fórmico (HCOOH) 0,5% (v/v) (A) na vazão de 0,8 mL/min, empregando-se o seguinte gradiente de eluição: 5-15% de B em 20 min; 15-19% de B em 40 min; 19-100% de B em 5 min; isocrático em 100% de B durante 10 min; retornando para a condição inicial variando-se de 100 a 5% de B em 5 min. O tempo de condicionamento da coluna entre as análises foi de 55 minutos mantendo 5% de B.

Os dados adquiridos a partir dos *fingerprints* cromatográficos foram enviados para o Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), para a realização da análise quimiométrica (PCA) empregando-se o *software* PIROUETTE®, versão 4.0 (Infometrix). Antes da PCA os dados passaram por um pré-tratamento, que foi realizado pelo programa computacional Matlab (versão 2009a, The MathWorks, Natick, MA, EUA).



### 3.7 Isolamento e identificação estrutural dos compostos químicos

Para o isolamento e identificação dos constituintes de *L. alba* foi utilizado o extrato preparado por infusão a partir do acesso 54 da coleta de inverno, **54II**. Para isso, esse extrato foi dissolvido em água deionizada resultando em uma solução de concentração 5 mg/mL e na sequência submetido à centrifugação em 13.300 rpm durante 5 min e transferido para o *vial* de análise.

As análises no CL-DAD-SPE para o isolamento dos compostos foram feitas em um cromatógrafo líquido da marca Agilent 1200 series (**Sistema Agilent**, seção 3.2). Para a aquisição dos dados foi utilizado o *software* Hystar 2.3 (Bruker).

Para a separação prévia dos compostos presentes no extrato **54II** foi utilizada uma coluna analítica Kinetex C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex) conectada a uma coluna de guarda de mesma fase estacionária, ambas a uma temperatura de 45 °C. A fase móvel utilizada foi constituída por uma mistura binária de acetonitrila acidificada com 0,025% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) (B) e uma solução aquosa de ácido trifluoroacético (TFA) 0,025% (v/v) (A), empregando uma vazão de 0,8 mL/min.

O isolamento dos compostos foi realizado em dois experimentos, empregando-se dois gradientes de eluição diferentes, gradiente 1 (trapeamento 1): 5-15% de B em 20 min; 15-17% de B em 20 min; 17-100% de B em 00,01 min; 100-100% de B em 10 min; 100-5% de B em 00,01 min, com tempo de condicionamento da coluna de 30 minutos mantendo-se 5% de B durante esse tempo, e gradiente 2 (trapeamento 2): 5-15% de B em 20 min; 15-17% de B em 30 min; 17-100% de B em 00,01 min; 100-100% de B em 15 min; 100-5% de B em 00,01 min, com tempo de condicionamento da coluna de 40 minutos mantendo-se 5% de B.

Durante o trapeamento 1 foram isoladas as substâncias codificadas como **R1**, **R2**, **R3** e **R4**. Adicionalmente, no trapeamento 2 foram isoladas as substâncias codificadas como **R5**, **R6**, **R7**, **R8** e **R9**, além das substâncias **R1** e **R2**, novamente.

Em cada experimento foram realizadas 20 análises, sendo que para cada uma delas o volume de amostra injetado foi de 25  $\mu$ L. O comprimento de onda utilizado durante os experimentos para o monitoramento das bandas cromatográficas foi de 205 nm.

O método *threshold* (método que usa a seleção pela intensidade da banda) e *time slice* (método que usa a seleção das bandas por intervalo de tempo de análise) foram utilizados para selecionar e trapear as bandas cromatográficas (substâncias) de interesse. Apenas duas substâncias foram isoladas por *threshold* (**R3** e **R4**) devido as suas maiores intensidade de absorção em 205 nm; as demais (**R1**, **R2** e **R5** a **R9**) foram trapeadas pelo método *time slice*.

O cromatógrafo utilizado está acoplado a uma trocadora de cartuchos automática (Prospekt 3 Bruker) equipado com vários micro cartuchos contendo diferentes fases estacionárias para o qual o fluxo foi automaticamente dirigido com o auxílio de uma bomba Knauer (Bruker K120 pump control), utilizando água deionizada na vazão de 3 mL/min como solvente de carreamento dos compostos até os micro cartuchos. Os cartuchos de SPE utilizados foram de fase estacionária polidivinilbenzeno.

Após o processo de adsorção dos compostos nos cartuchos de SPE procedeu-se a evaporação do solvente residual através de um fluxo de nitrogênio gasoso por 30 minutos cada. Os compostos capturados foram eluídos dos cartuchos utilizando metanol (**R3** a **R9**) e acetonitrila (**R1** e **R2**), ambos deuterados (99,8%), sendo, posteriormente, acondicionados em vidros âmbar de 2 mL e armazenados em freezer até a realização dos experimentos de RMN (1D e 2D) em um espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker 600 MHz (seção 3.4). O *software* Topspin (Bruker) foi utilizado para a aquisição dos dados de RMN. Após serem utilizados, os cartuchos foram automaticamente recondicionados, para posteriores reutilizações, com acetonitrila grau HPLC durante 2 minutos em uma vazão de 2 mL/min e equilibrados por 4 minutos com água deionizada em uma vazão de 1 mL/min.

Para determinação estrutural dos compostos trapeados foram realizados experimentos de RMN  $^1\text{H}$  com pré-saturação suprimindo o sinal residual de

água (para os espectros adquiridos em MeOH- $d_4$ , NOESYGPPR1D),  $g$ COSY,  $g$ HSQC e  $g$ HMBC, para os compostos que foram isolados em concentração necessária para os experimentos. Os dois últimos experimentos permitiram a determinação indireta dos deslocamentos químicos de carbono-13 de algumas estruturas propostas.

As análises por RMN foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Departamento de Química (DQ-UFSCar), sob a supervisão do Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira e da Msc. Thayana da Conceição Alves.

### **3.8 Estudo de citotoxicidade em linhagens de células tumorais *in vitro***

Para a realização dos testes antitumorais, os extratos foram diluídos em DMSO puro estéril na concentração de 10 mg/mL e testados na concentração única de 50  $\mu$ g/mL.

Foram utilizadas células tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL-60 (leucemia promielocítica humana) doadas pelo Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP, Brasil. As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm<sup>3</sup>, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI 1640 e suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células desprendessem das paredes das garrafas. As culturas de células apresentaram-se negativas para micoplasma.

Para avaliar a citotoxicidade dos extratos, o ensaio do alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição com as amostras testes.

Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (100  $\mu$ L/poço de uma solução de  $0,3 \times 10^6$  células/mL para células em suspensão e  $0,7 \times 10^5$  células/mL para células aderidas). Após 24 horas de incubação, os

compostos testes dissolvidos em DMSO foram adicionados em cada poço e incubados por 72 horas. A Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Quatro horas antes do final do período de incubação, 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa.

Os ensaios de atividades citotóxicas foram realizados pelo Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra, da FIOCRUZ-Bahia, que estabelece parceria com nosso grupo de pesquisa, LABORGANICS, do Departamento de Química, da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

### 3.9 Estudo da atividade de inibição enzimática *in vitro*

Para a realização dos ensaios de inibição enzimática os extratos foram submetidos à triagem de inibição pontual (uma única concentração testada) para a enzima acetilcolinesterase (AChE) isoforma de peixe elétrico (eelAChE). Para isso, foram utilizadas as enzimas AChE (de peixe elétrico, Tipo VI-S) (Sigma-Aldrich, C2888) imobilizadas covalentemente em capilar de sílica fundida (30 cm x 0,375mm x 100 µm d.i.) sendo denominadas ICER-AChE<sub>eel</sub> [104, 109, 110].

No processo de imobilização foi utilizada uma solução contendo 2 unidades de enzima para 1 mL, sendo o valor de  $K_{mapp}$  (70 µM), a constante de Michaelis-Menten (concentração do substrato ACh onde se obtém uma velocidade inicial de reação igual à metade da velocidade máxima de catálise enzimática), determinado utilizando concentrações crescentes do substrato acetilcolina (0,25 a 150 µM). Assim, para a realização dos ensaios de inibição foi utilizada ACh na concentração de 70 µM.

O ICER-AChE<sub>eel</sub> foi utilizado como um biorreator enzimático acoplado a um instrumento de cromatografia líquida de alta eficiência e um espectrômetro de massas (**Sistema Nexera XR**, seção 3.2) formando um sistema *on-flow*

para a realização de ensaios de *screening* de inibidores enzimáticos. Neste sistema a reação enzimática é monitorada pela quantificação direta do produto da hidrólise enzimática da acetilcolina (ACh), a colina (razão massa/carga -  $m/z$  104), sendo comparada com a atividade da galantamina como inibidor padrão.

Para o *screening* de inibição enzimática pontual foi empregada fase móvel constituída por uma solução de acetato de amônio 15 mM em pH 8,0, na vazão de 0,05 mL/min; utilizando volume de injeção de 10  $\mu$ L de uma solução contendo 70  $\mu$ M de ACh e 200  $\mu$ g/mL de cada extrato avaliado como inibidor. O inibidor padrão (galantamina) foi utilizado na concentração de 100  $\mu$ M. O ICER-AChE<sub>eel</sub> foi previamente preparado e utilizado para o ensaio anticolinesterásico de acordo com protocolo do Laboratório de Cromatografia de Bioafinidade e Produtos Naturais [104, 109].

Os percentuais de inibição foram obtidos comparando-se a área da banda cromatográfica para a colina considerando a atividade da enzima na presença do inibidor ( $A_i$ ) com a área da banda da colina considerando a atividade da enzima na ausência de inibidor ( $A_0$ ), de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = \left[ 1 - \frac{A_i}{A_0} \right] \times 100$$

As soluções estoques (5 mg/mL) de cada extrato testado foram preparadas em solventes adequados de acordo com seu método de obtenção. Amostras preparadas por infusão foram solubilizadas em água ultrapura e as amostras hidroalcoólicas foram solubilizadas em uma solução hidroalcoólica 1:1 (v/v) metanol/água. A dissolução de cada amostra para o preparo da solução estoque foi auxiliada por ultrassom durante 5 min a temperatura ambiente. Na sequência, cada solução foi centrifugada por 5 min a 10.000 rpm. As soluções de trabalho a serem utilizadas (concentração de 2 mg/mL) foram preparadas pela diluição das soluções estoques com água ultrapura.

A partir de cada solução de trabalho dos extratos (2 mg/mL), foram pipetados 10  $\mu$ L (concentração final 200  $\mu$ g/mL) e misturados com 20  $\mu$ L da solução de acetilcolina (concentração final 70  $\mu$ M) e 70  $\mu$ L da solução de acetato de amônio 15 mM em pH 8,0. O volume final do meio reacional foi de

100  $\mu\text{L}$ . As soluções foram preparadas em duplicatas e alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  foram injetadas no ICER-AChE<sub>eel</sub>.

Entre a análise de cada amostra foi realizado um controle positivo, que consiste na avaliação da atividade enzimática sem o extrato candidato a inibidor, sendo o meio reacional composto por 70  $\mu\text{L}$  da solução de acetato de amônio 15 mM em pH 8,0, 20  $\mu\text{L}$  da solução de ACh e 10  $\mu\text{L}$  de água ultrapura.

Adicionalmente, após o ensaio de cada amostra, foi realizado um controle negativo, que consiste da avaliação de cada extrato na presença da ACh, porém utilizando um reator sem a enzima imobilizada. Esse ensaio é realizado para avaliar a interferência do extrato na hidrólise espontânea da ACh.

Os ensaios de atividades anticolinesterásicas foram realizados sob a supervisão da Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso e da Dra. Claudia Seidl do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP-Ribeirão Preto.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Preparação dos extratos aquosos e hidroalcoólicos

Os procedimentos de extração por infusão (extrato aquoso) e maceração (extrato hidroalcoólico) estão entre as formas populares mais utilizadas para a obtenção de preparações para fins terapêuticos utilizando plantas medicinais [12, 18, 36]. Considerando estas informações, houve interesse em se investigar tais métodos de extração.

Os rendimentos (massas) dos extratos aquosos e hidroalcoólicos obtidos das folhas dos seis diferentes acessos de *L. alba* (01, 02, 24, 32, 39 e 54) e coletados durante o verão e o inverno estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Rendimento dos extratos aquosos e hidroalcoólicos preparados a partir das folhas de diferentes acessos de *L. alba*.

Amostra	Infusão (Aquoso)		Maceração (Hidroalcoólico)	
Acesso	Massa (mg) (Verão)	Massa (mg) (Inverno)	Massa (mg) (Verão)	Massa (mg) (Inverno)
01	724,8	527,3	630,4	493,3
02	658,7	509,1	523,0	456,1
24	720,6	730,7	561,4	520,3
32	532,3	517,1	614,4	495,6
39	422,6	566,3	524,6	440,8
54	528,1	461,2	432,0	431,5

Comparando o efeito da sazonalidade (época de coleta) sob os extratos preparados pelo método de infusão dos acessos de *L. alba* (Tabela 1), pode-se observar que, com exceção das amostras 24 e 39, as extrações do verão apresentaram maior rendimento quando comparadas as de inverno. Ainda considerando a sazonalidade, porém com relação aos extratos preparados por maceração (hidroalcoólicos), foi observado que todas as amostras da coleta de verão apresentaram maiores massas.

Com relação ao efeito do método de extração, comparando-se somente as amostras da coleta de verão, verificou-se que o método de extração por

infusão exibiu maiores rendimentos quando confrontadas com as amostras obtidas por maceração, com exceção dos extratos 32 e 39. Entre os extratos preparados no inverno, aqueles obtidos por infusão apresentaram maiores rendimentos do que os seus respectivos que foram extraídos por maceração.

Através das massas resultantes de cada extrato (Tabela 1), pode-se supor que a variação no rendimento entre os extratos obtidos está relacionada ao fato de que o conteúdo de metabólitos secundários existentes em plantas medicinais pode variar de acordo com a forma de processamento do material vegetal (métodos de extração) [115] e sazonalidade [9, 15]. Além disso, plantas da mesma espécie podem apresentar material genético distinto ou serem identificadas como quimiotipos diferentes e, por consequência, seus indivíduos podem apresentar diferenças químicas entre si. Estas diferenças na composição química dos metabólitos secundários podem ser quantitativas e/ou qualitativas, ou seja, podem ser produzidas quantidades e/ou tipos diferentes de compostos químicos [4, 15, 115].

Neste contexto, foram escolhidos dois métodos de extração (infusão e maceração hidroalcoólica), duas coletas em épocas diferentes (verão e inverno), utilizando diferentes acessos de *L. alba* (01, 02, 24, 32, 39 e 54) a fim de se estudar a influência destes fatores no conteúdo de metabólitos secundários desta espécie e verificar qual(is) da(s) amostra(s) apresenta(m) maior(es) potencial(is) citotóxico(s) e anticolinesterásico(s) frente as linhagens de células neoplásicas avaliadas (HepG2 e HL-60) e a enzima acetilcolinesterase (AChE), respectivamente.

## **4.2 Condições cromatográficas de análise**

Após a coleta e obtenção dos extratos das folhas de *L. alba*, foram iniciadas as análises por CL-DAD para a obtenção dos *fingerprints* cromatográficos.

É importante ressaltar que a parte inicial do trabalho, referente ao desenvolvimento do método cromatográfico, foi realizada em um cromatógrafo



líquido semi-preparativo Shimadzu (Quioto, Japão) modelo Prominence (**sistema semi-preparativo**, descrito na seção 3.2).

Assim, primeiramente, faz-se necessário realizar a otimização das condições cromatográficas de análise. Para tanto, foram avaliados os efeitos dos seguintes fatores: natureza da fase estacionária ( $C_{18}$  e hexil-fenil), modificador orgânico (metanol - MeOH e acetonitrila - ACN), pH e temperatura da coluna; descritos na literatura como variáveis fundamentais a serem consideradas no que se refere ao desenvolvimento de um método de análise por Cromatografia Líquida, pois estão relacionados com a seletividade cromatográfica e, por consequência, podem influenciar na sua resolução [53, 55, 139].

#### 4.2.1 **Análises cromatográficas no sistema semi-preparativo**

Snyder *et al.* [53] sugerem que a aplicação de um gradiente exploratório linear em que se varia o percentual de acetonitrila (B) em mistura com água (A) (como fase móvel) de 5 a 100% em um dado intervalo de tempo, utilizando-se uma coluna de fase estacionária  $C_{18}$ , com vazão de fase móvel de 2,0 mL/min, é uma importante forma de se analisar uma amostra desconhecida, além de verificar as dificuldades do desenvolvimento de um método cromatográfico e planejar os experimentos futuros. Alternativamente, um gradiente exploratório utilizando-se metanol e água como fase móvel também pode ser usado [140].

Nesse sentido, análises preliminares foram realizadas utilizando-se o gradiente exploratório linear proposto por Snyder *et al.* [53] com algumas modificações: variando-se a proporção do modificador orgânico (MeOH ou ACN) de 5 a 100% em 60 min, empregando uma vazão da fase móvel de 1,0 mL/min, com o objetivo de avaliar a melhor condição de partida para a posterior otimização das condições cromatográficas de análise requeridas para a separação dos constituintes químicos presentes nos extratos estudados.

Os parâmetros inicialmente testados (fase estacionária e fase móvel), utilizando a análise por gradiente exploratório linear, estão listados na Tabela 2.

Para as análises cromatográficas iniciais foi utilizado o extrato da infusão das folhas do acesso LA02 coletado no verão, pois havia uma maior quantidade disponível de suas folhas quando comparado aos demais. Essa amostra será indicada como **02IV** (02, indicando o acesso e as abreviaturas I e V significando, respectivamente, infusão e verão).

Durante as análises no sistema **semi-preparativo** foi utilizada vazão da fase móvel de 1,0 mL/min e volume de injeção da amostra de 25 µL.

**Tabela 2:** Análises iniciais, utilizando gradiente exploratório linear, para a otimização das condições cromatográficas de separação do extrato **02IV**.

Análise	Fase Estacionária	Fase Móvel
1	C <sub>18</sub>	MeOH:H <sub>2</sub> O
2	C <sub>18</sub>	ACN:H <sub>2</sub> O
3	Hexil-Fenil	MeOH:H <sub>2</sub> O
4	Hexil-Fenil	ACN:H <sub>2</sub> O

Segundo Lanças [54], o usuário de cromatografia líquida deve selecionar a coluna mais apropriada para a separação a qual se deseja realizar. Neste contexto, a fase estacionária C<sub>18</sub> é, frequentemente, a primeira escolha para separações cromatográficas em fase reversa, mostrando-se eficiente para a separação de uma grande variedade de compostos, incluindo os fenólicos e insaturados.

A separação cromatográfica nesse tipo de fase estacionária (apolar) é governada, em grande parte, por interações hidrofóbicas entre a cadeia hidrocarbônica apolar desta fase e a parte apolar dos analitos presentes em uma determinada amostra [54, 55].

Em contrapartida, apesar da grande popularidade das fases estacionárias C<sub>18</sub>, as colunas de fase estacionária hexil-fenil têm ganhado destaque nos últimos tempos. Tal fato está relacionado ao seu potencial de seletividade diferenciada para análises de substâncias aromáticas atribuído a sua capacidade de formar ligações do tipo π-π com estes compostos, sendo, conseqüentemente, empregadas nas análises cromatográficas de amostras que os contêm [141].

Portanto, além de estarem disponíveis em nosso laboratório, a escolha destas fases estacionárias (C<sub>18</sub> e hexil-fenil) para as análises cromatográficas das amostras de *L. alba* não se deu de forma aleatória, visto que na literatura são relatadas a presença de diversos compostos aromáticos como constituintes químicos pertencentes às várias espécies deste gênero [81, 115, 126].

Com relação aos modificadores orgânicos (Tabela 2), o metanol (MeOH) e a acetonitrila (ACN) foram escolhidos por se destacarem na literatura como os mais utilizados, formando juntamente com a água, em proporções variadas, as fases móveis mais empregadas em cromatografia em fase reversa [62, 81, 115, 126].

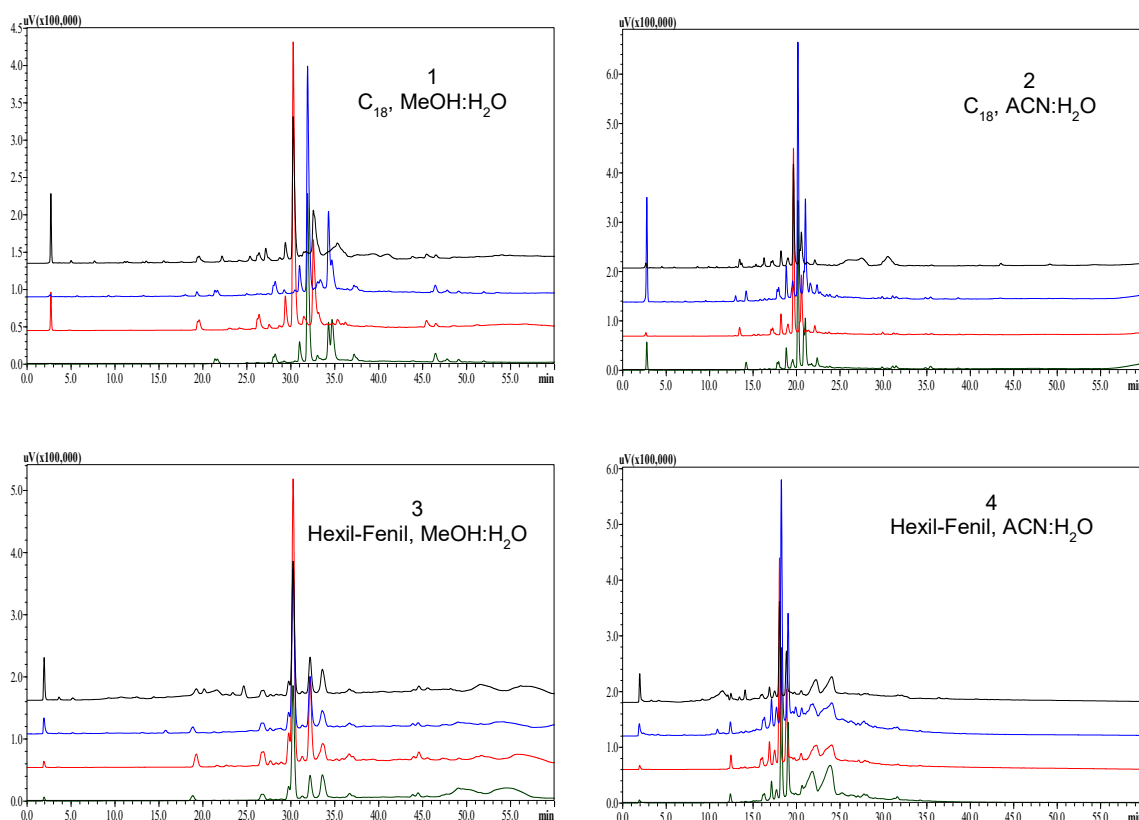
Além disso, o MeOH e a ACN possuem seletividades distintas, ou seja, podem interagir de maneira diferente com os analitos das amostras e apresentam baixas viscosidades em comparação com outros solventes, acarretando menor pressão no sistema cromatográfico, contribuindo para a diminuição de desgaste da coluna cromatográfica e do sistema de bombas [54, 55].

Outra característica vantajosa é a compatibilidade destes solventes com o detector por radiação ultravioleta (UV), pois absorvem mais intensamente esta radiação em baixos comprimentos de onda, a acetonitrila abaixo de 190 nm e o metanol abaixo de 205 nm [55, 142]. Estes valores são inferiores aos comprimentos de onda empregados para detectar a maioria dos compostos comumente presentes nas amostras estudadas, tais como compostos fenólicos, que podem apresentar máximos de absorção UV no intervalo de comprimento de onda entre 240 e 380 nm [115, 117].

Para aquisição dos cromatogramas (Figura 3), resultantes das condições de análises exploratórias (aplicando-se as variáveis descritas na Tabela 2), foram avaliados diferentes comprimentos de onda: 254, 280, 320, 360 nm, com o intuito de verificar em qual deles seria possível observar o maior número de bandas cromatográficas. Os comprimentos de onda selecionados para a detecção nestas análises estão relacionados aos tipos de compostos

supostamente presentes nos extratos provenientes de espécies do gênero *Lippia*, tais como: flavonóides, fenilpropanóides e iridóides [81, 115, 117, 126].

**Figura 3:** Cromatogramas adquiridos a partir do extrato **02IV**, utilizando vazão da fase móvel de 1,0 mL/min e volume de injeção de 25  $\mu$ L, em diferentes comprimentos de onda (nm): 254 (Preto); 280 (Azul); 320 (Vermelho); 360 (Verde).



Analizando os cromatogramas da Figura 3, comparando-se, a princípio, o uso de colunas de fases estacionárias diferentes, utilizando o mesmo modificador orgânico (comparando-se a condição 1 e 3 entre si e da mesma forma as condições 2 e 4), não se observou grandes diferenças entre os cromatogramas adquiridos, apesar destas duas fases estacionárias apresentarem, em parte, mecanismos de separação diferentes [53, 141].

Considerando o uso do MeOH e ACN como modificadores orgânicos, utilizando a fase C<sub>18</sub> (Figura 3, cromatogramas 1 e 2) e hexil-fenil (Figura 3, cromatogramas 3 e 4), observa-se uma pequena diferença com relação ao

número de bandas e a retenção dos compostos, quando se comparou o efeito desses modificadores em cada fase estacionária.

A partir desses resultados preliminares, propõe-se que o uso da ACN como modificador orgânico seria o mais adequado para o extrato analisado, visto que nas condições em que ela foi empregada (cromatogramas 2 e 4, Figura 3) observou-se, aparentemente, um número de bandas ligeiramente maior quando confrontadas àquelas utilizando-se o MeOH.

Adicionalmente, comparando-se os comprimentos de onda avaliados (254, 280, 320 e 360 nm), optou-se pelo 254 nm o qual foi capaz de detectar o maior número de bandas nas análises realizadas (Figura 3). Em contrapartida, a partir dessas primeiras análises, não se pôde inferir muito a respeito da fase estacionária mais apropriada para a separação, devido a semelhança visual, principalmente com relação ao números de bandas obtidas, entre os perfis cromatográficos 2 e 4.

Feito a escolha das condições iniciais de análise (254 nm para a detecção dos compostos e ACN/H<sub>2</sub>O como fase móvel), deu-se continuidade ao desenvolvimento do *fingerprint* cromatográfico. Para tanto, foram testadas outras variáveis que podem afetar a eficiência cromatográfica, tais como: acidificação da fase móvel, o uso de gradiente de eluição e temperatura da coluna [53].

Segundo Lanças [54], compostos que possuem caráter ácido ou básico podem sofrer ionização, quando em contato com a fase móvel, especialmente em cromatografia em fase reversa, podendo causar alargamentos e/ou deformações das bandas cromatográficas e, desta forma, comprometer o processo de separação.

Nesse sentido, levando em consideração que derivados de flavonóides e fenilpropanóides são classes de compostos comumente encontrados em extratos das espécies do gênero *Lippia* e que eles podem sofrer ionização, torna-se importante o ajuste do pH da fase móvel para a supressão desta ionização através da adição de tampão ou ácidos fracos, como o ácido acético e o ácido fórmico [38, 139, 143].

Portanto, as análises subsequentes foram realizadas adicionando-se ácido fórmico ao solvente aquoso para manter o pH da fase móvel em valores abaixo da neutralidade (ácido) para controlar a possível ionização das substâncias presentes na amostra. O ácido fórmico foi escolhido por ser um ácido fraco, pouco agressivo ao sistema cromatográfico, quando comparado ao uso de tampões que podem acarretar problemas como a formação de precipitados, tanto na coluna como no sistema cromatográfico [143]. Além disso, esse ácido fraco se mostrou adequado para as análises por cromatografia líquida de extratos vegetais contendo compostos aromáticos, sendo relatado em diversos trabalhos na literatura [15, 60, 114, 115].

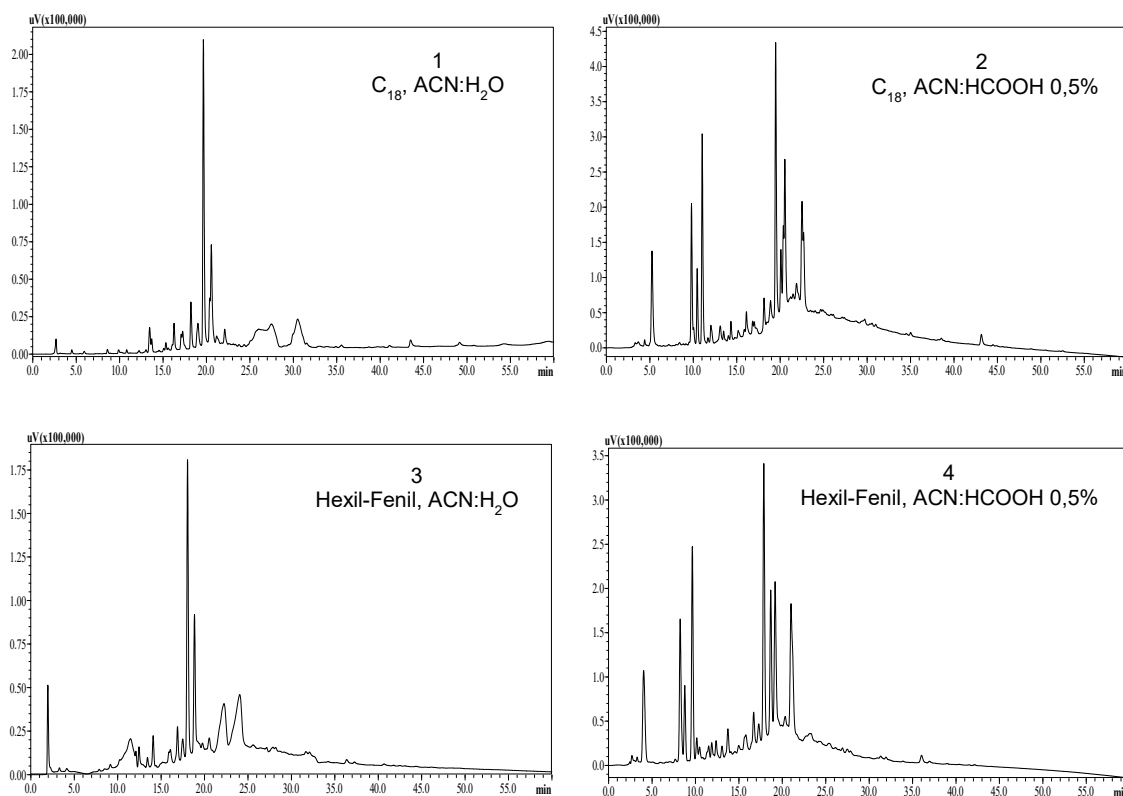
Sendo assim, foram realizados gradientes exploratórios lineares aplicando-se a mistura composta por ACN (B), previamente escolhida como modificador orgânico, e solução aquosa de ácido fórmico (HCOOH) a 0,5% (v/v) (A) como fase móvel, empregando-se as duas fases estacionárias avaliadas anteriormente, C<sub>18</sub> e hexil-fenil. Os resultados obtidos destas análises foram confrontados àqueles obtidos empregando-se ACN:H<sub>2</sub>O como fase móvel. Para melhor entendimento e visualização, os parâmetros comparados nesta etapa estão dispostos na Tabela 3.

**Tabela 3:** Análises iniciais utilizando-se gradiente exploratório linear, com e sem o emprego de HCOOH a 0,5% (v/v) ao solvente aquoso, para a otimização das condições cromatográficas de separação do extrato **02IV**.

Análise	Fase Estacionária	Fase Móvel
1	C <sub>18</sub>	ACN:H <sub>2</sub> O
2	C <sub>18</sub>	ACN:HCOOH 0,5% (v/v)
3	Hexil-Fenil	ACN:H <sub>2</sub> O
4	Hexil-Fenil	ACN:HCOOH 0,5% (v/v)

Para fins de comparação, na Figura 4 estão mostrados os cromatogramas obtidos aplicando-se o gradiente exploratório linear, seguindo as condições descritas na Tabela 3 com detecção em 254 nm.

**Figura 4:** Comparação entre os cromatogramas adquiridos utilizando-se gradiente exploratório linear, empregando-se como fase móvel: ACN:H<sub>2</sub>O (1 e 3) e ACN:HCOOH 0,5% (v/v) (2 e 4), utilizando as fases estacionárias C<sub>18</sub> e hexil-fenil.



Avaliando-se a Figura 4 pode-se observar a importância da acidificação da fase móvel. Comparando-se os resultados obtidos para a coluna C<sub>18</sub>, observa-se uma intensificação das bandas compreendidas entre os tempos de retenção de 9 e 13 minutos quando a fase móvel foi acidificada com HCOOH a 0,5% (v/v) (cromatograma 2). Além disso, percebe-se uma maior resolução das bandas encontradas em maior tempo de retenção, no intervalo entre 22 e 25 minutos (cromatograma 2), quando comparado aos resultados obtidos antes da acidificação da fase móvel (cromatograma 1, no qual estas bandas eluíam entre os tempos de retenção de 25 e 34 minutos). No geral, comportamento semelhante foi observado quando comparados os resultados, antes e após a acidificação da fase móvel, empregando-se a coluna de fase estacionária hexil-fenil (cromatogramas 3 e 4).

Adicionalmente, comparando-se os resultados obtidos com a mudança das fases estacionárias após a acidificação da fase móvel (cromatograma 2 frente ao 4, Figura 4), percebe-se uma semelhança entre os perfis obtidos, principalmente, no que diz respeito ao número de bandas observadas, o que indica similaridade na eficiência destas colunas em relação a separação dos compostos presentes na amostra analisada.

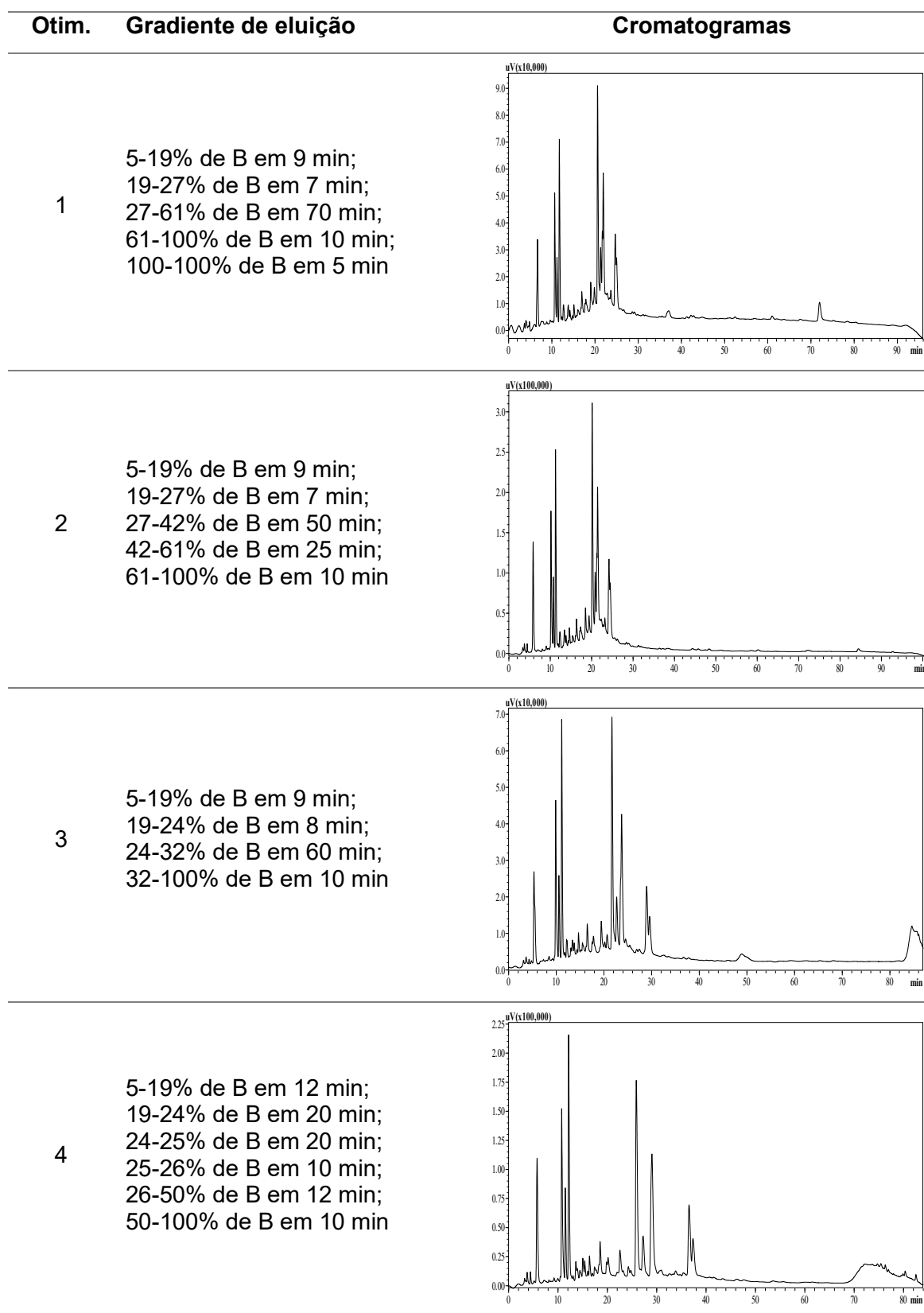
A variação na intensidade relativa das bandas cromatográficas, após acidificação da fase móvel (cromatogramas 2 e 4, Figura 4), provavelmente, está relacionada ao fato de alguns grupos químicos, em determinados compostos, serem sensíveis a modificação do pH do meio, alterando assim, a sua forma química, e, conseqüentemente, a sua capacidade de absorção da radiação eletromagnética, neste caso, em 254 nm [144, 145]. Além disso, a variação do tempo de retenção de algumas bandas cromatográficas, devido ao ajuste do pH da fase móvel com o ácido fórmico, também pode ser explicada pela alteração da forma química (seja ela ionizada ou neutra) das espécies presentes, pois esta alteração pode afetar o grau de interação destes compostos com a fase estacionária [54, 143, 145].

Uma vez que a utilização da fase móvel acidificada possibilitou a obtenção de cromatogramas com maior número de bandas detectáveis (em 254 nm) e com melhor resolução, optou-se por escolhê-la para as otimizações cromatográficas posteriores. Com relação a fase estacionária, apesar de não haver grandes diferenças entre os cromatogramas 2 e 4 apresentados na Figura 4, a fase estacionária C<sub>18</sub> foi a que proporcionou, de certa forma, a observação de bandas com maiores intensidade, sendo então selecionada para os experimentos subsequentes.

Portanto, para as otimizações cromatográficas posteriores, empregando-se gradiente de eluição da fase móvel, foram utilizados os seguintes parâmetros: coluna de fase estacionária C<sub>18</sub> LUNA<sup>®</sup> (250 x 4,6 mm, dp 5 µm, Phenomenex); fase móvel constituída por ACN e HCOOH a 0,5% (v/v); vazão da fase móvel de 1,0 mL/min e detecção em 254 nm. As otimizações realizadas estão mostradas na Figura 5, na qual as diferentes modificações efetuadas no gradiente estão relacionadas aos seus respectivos cromatogramas.

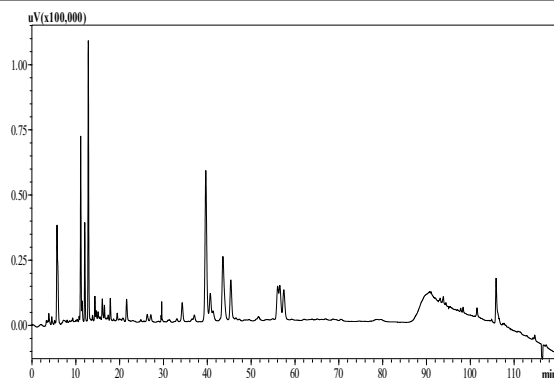


**Figura 5:** Otimizações cromatográficas utilizando-se o modo gradiente de eluição, para a obtenção do perfil cromatográfico de *L. alba*, empregando-se vazão de 1,0 mL/min e detecção em 254 nm.



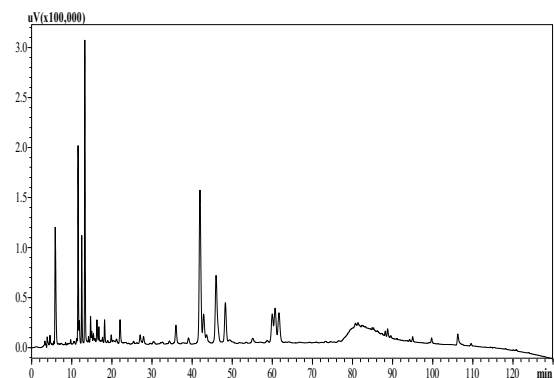
5

5-15% de B em 10 min;  
15-24% de B em 50 min;  
24-25% de B em 20 min;  
25-38% de B em 5 min;  
38-100% de B em 35 min



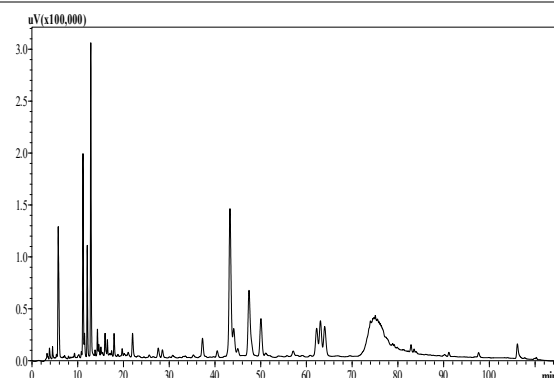
6

5-15% de B em 10 min;  
15-24% de B em 60 min;  
24-38% de B em 10 min;  
38-68% de B em 30 min;  
68-100% de B em 20 min



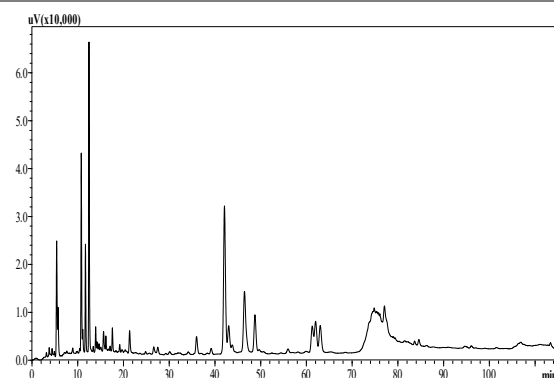
7

5-15% de B em 10 min;  
15-23% de B em 55 min;  
23-35% de B em 5 min;  
35-50% de B em 25 min;  
50-75% de B em 20 min



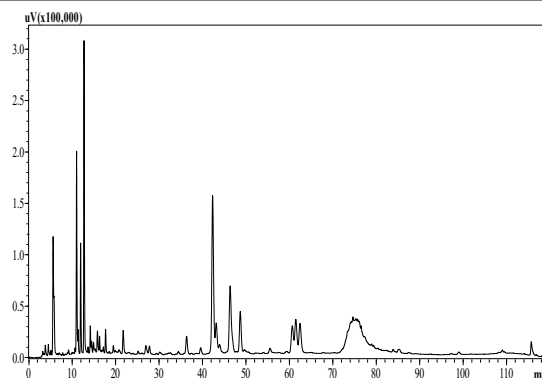
8

5-15% de B em 10 min;  
15-23% de B em 55 min;  
23-35% de B em 5 min;  
35-42% de B em 30 min;  
42-50% de B em 5 min;  
50-75% de B em 10 min



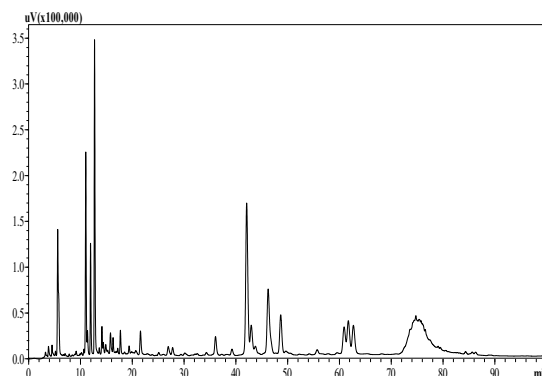
9

5-15% de B em 10 min;  
 15-23% de B em 55 min;  
 23-35% de B em 5 min;  
 35-37% de B em 20 min;  
 37-42% de B em 10 min;  
 42-50% de B em 5 min;  
 50-75% de B em 10 min;  
 75-75% de B em 5 min



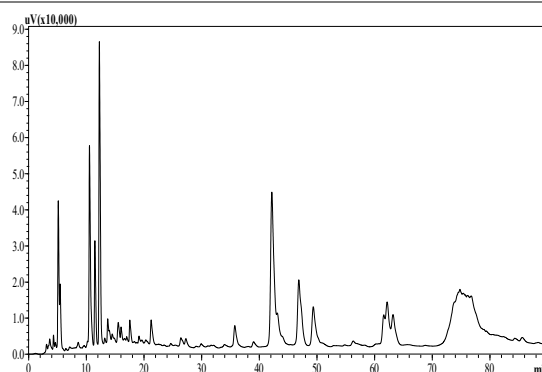
10

5-15% de B em 10 min;  
 15-23% de B em 55 min;  
 23-35% de B em 5 min;  
 35-35% de B em 15 min;  
 35-37% de B em 10 min;  
 37-50% de B em 10 min;  
 50-75% de B em 10 min;  
 75-75% de B em 5 min



11

5-15% de B em 10 min;  
 15-23% de B em 55 min;  
 23-35% de B em 5 min;  
 35-36% de B em 20 min;  
 36-42% de B em 15 min;  
 42-75% de B em 10 min;  
 75-75% de B em 5 min



Otim.: Otimização

O modo gradiente de eluição, em que a composição da fase móvel varia durante a análise cromatográfica, é utilizado para separação de amostras complexas e/ou de composição desconhecida (como extratos vegetais), para as quais a eluição isocrática não é tão eficiente [37, 81, 115, 117], sendo, desta forma, adequada para o tipo de análise realizada neste trabalho.

Observando-se a Figura 5, nota-se uma melhoria significativa na separação cromatográfica partindo da condição **1** até a **10**. Entre os cromatogramas **10** e **11** não houve incremento na separação entre os

compostos. Desta forma, o gradiente **10** foi o escolhido para o prosseguimento do estudo.

Entretanto, o cromatograma **10** (Figura 5) apresentou algumas bandas estão alargadas e outras mal resolvidas. O alargamento de bandas cromatográficas pode ser atribuído, entre outros fatores, a coeluição de compostos existentes na amostra nestas condições de análise [55] ou a perda de eficiência da coluna que pode advir de diversos motivos como a saturação dos seus sítios ativos e formação de vazios na entrada da coluna causados pelo seu longo tempo de uso [146].

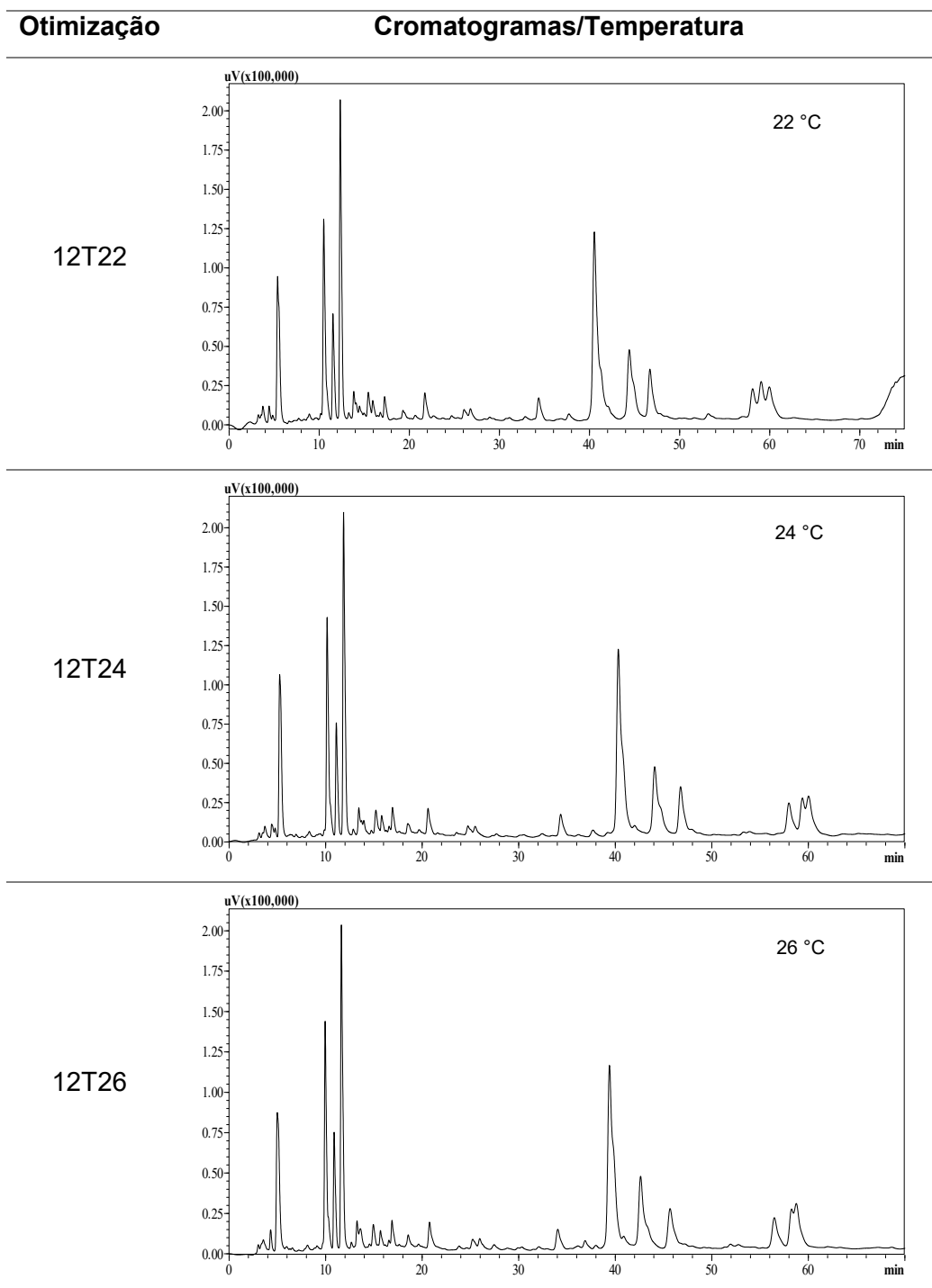
Outra variável que pode ser levada em consideração na melhoria da separação cromatográfica é a temperatura da coluna e, a depender da modalidade de cromatografia, da fase móvel como na Cromatografia Líquida em Alta Temperatura (HTLC, do inglês, *High Temperature Liquid Chromatography*). Determinados solutos podem sofrer variações significativas nos seus tempos de retenção em função da temperatura, que pode contribuir, em certos casos, para separações cromatográficas de misturas complexas. Além disso, em geral, o aumento da temperatura da fase móvel reduz o tempo de retenção dos compostos analisados como consequência da diminuição da viscosidade da fase móvel, permitindo uma diminuição do tempo de análise em CL e redução da pressão do sistema cromatográfico [147, 148].

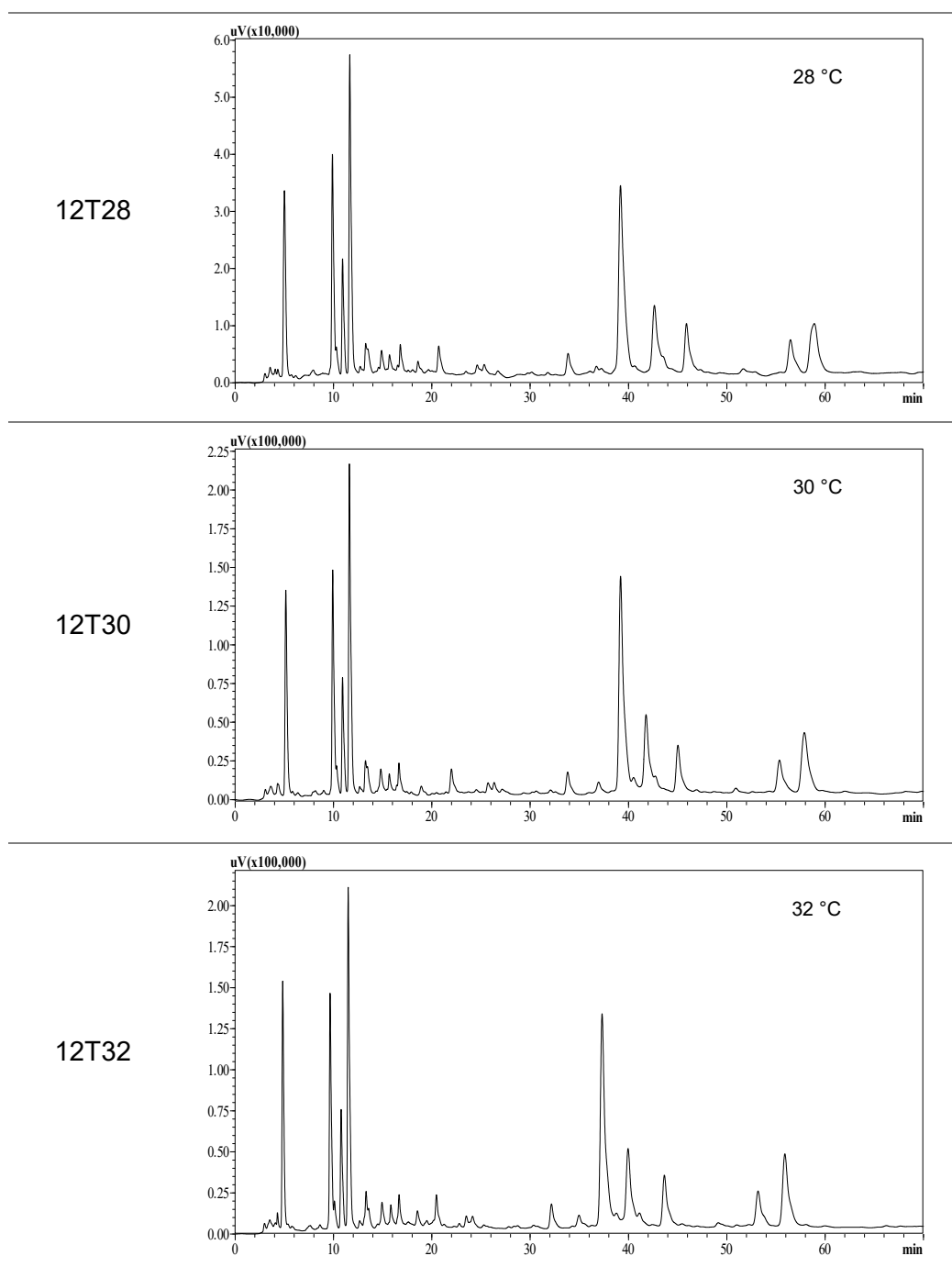
Portanto, análises adicionais foram efetuadas a fim de avaliar o efeito da temperatura da coluna na separação cromatográfica usando como ponto de partida o gradiente **10** (Figura 5) com uma leve modificação, nomeado como gradiente **12**: 5-15% de B em 10 min; 15-23% de B em 55 min; 23-35% de B em 5 min; 35-35% de B em 5 min; 35-5% de B em 10 min. Foram testadas temperaturas de 22 a 32 °C, variando-se de 2 em 2 °C. A escolha do limite superior de temperatura (32 °C) baseou-se nas análises de Timóteo *et al.* [115], que estudaram a mesma espécie (*L. alba*) e determinaram essa temperatura como a mais adequada para a separação de seus compostos.

Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 6, na qual as análises executadas, utilizando o gradiente **12**, foram denominadas: **12T22**, **12T24**,

**12T26**, **12T28**, **12T30** e **12T32** correspondendo, respectivamente, as temperaturas da coluna de 22, 24, 26, 28, 30 e 32 °C.

**Figura 6:** Efeito da temperatura da coluna (22 a 32°C) na separação cromatográfica utilizando-se o gradiente de eluição **12**: 5-15% de B em 10 min; 15-23% de B em 55 min; 23-35% de B em 5 min; 35-35% de B em 5 min; 35-5% de B em 10 min, e detecção até 75 min em 254 nm.



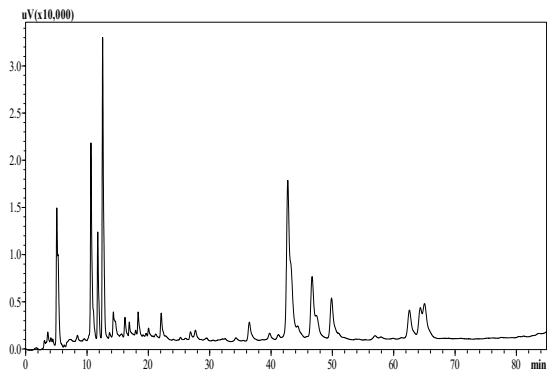
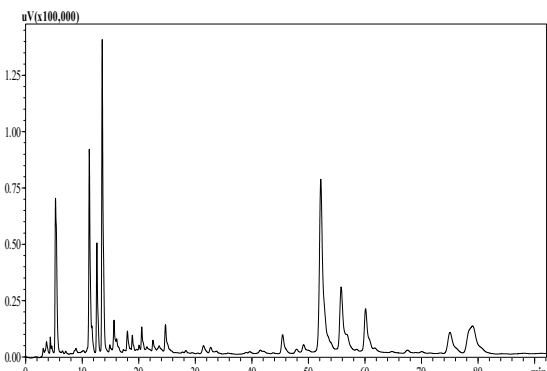
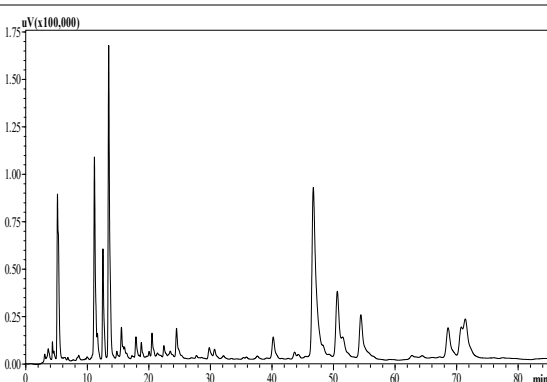


A partir desses resultados (Figura 6), foi possível inferir que entre as análises realizadas, aquela em que houve o aquecimento da coluna a 24 °C (condição **12T24**) foi a mais adequada para a separação destes analitos por proporcionar uma melhor separação entre alguns compostos em relação a otimização **10** (sem aquecimento da coluna, Figura 5).

Entretanto, foi observado que várias bandas cromatográficas acima de 36 min de corrida (Figura 6, condição **12T24**) estavam alargadas. Sendo assim,

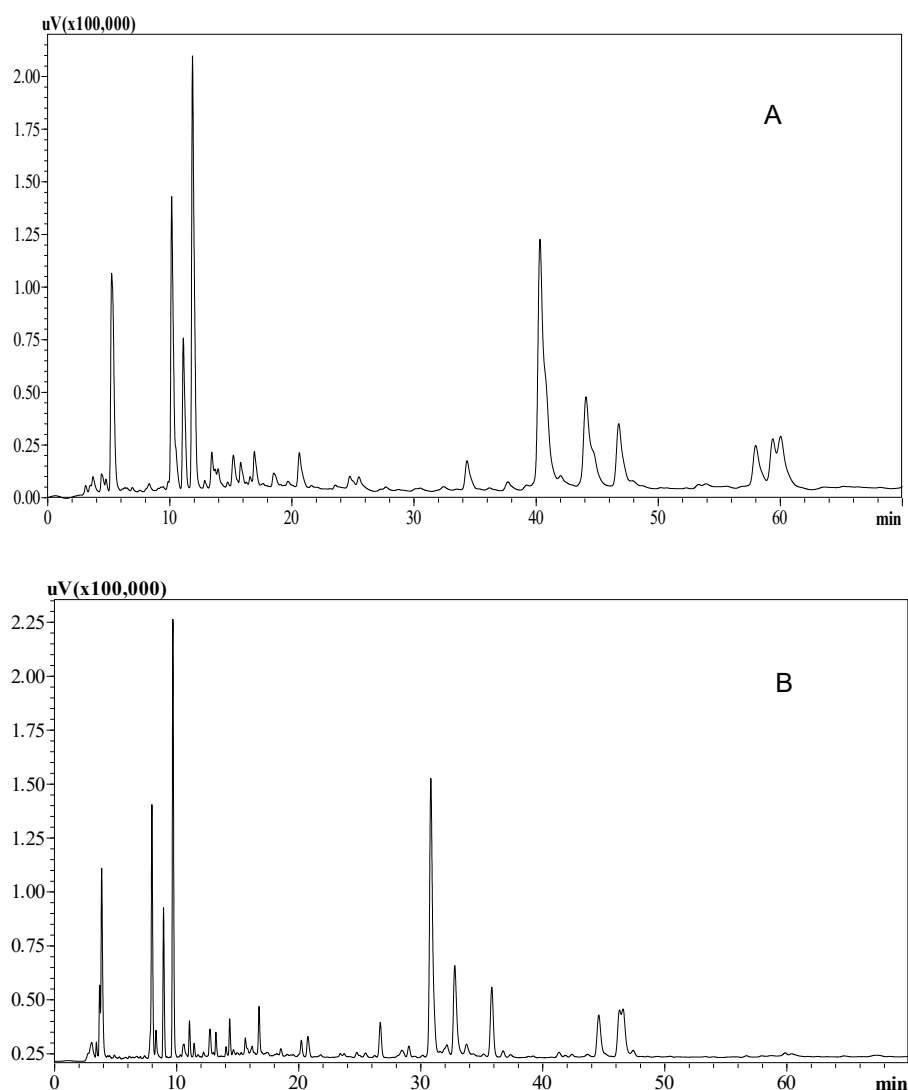
otimizações adicionais, na tentativa de verificar a possibilidade de coeluição entre compostos (dando origem a estas bandas), foram realizadas, porém sem modificações significativas em suas formas (otimizações **13** a **15**, Figura 7). Suspeitou-se, então, que a coluna cromatográfica havia perdido a eficiência, ao menos com relação a essa amostra, devido ao seu grande tempo de uso.

**Figura 7:** Otimizações cromatográficas adicionais utilizando-se o modo gradiente de eluição, temperatura da coluna a 24 °C, com vazão de 1,0 mL/min e detecção em 254 nm.

Otim.	Gradiente de eluição	Cromatogramas
13	5-15% de B em 12 min; 15-19% de B em 30 min; 19-23% de B em 38 min; 23-35% de B em 5 min	
14	5-15% de B em 15 min; 15-15% de B em 10 min; 15-19% de B em 30 min; 19-19% de B em 20 min; 19-23% de B em 30 min; 23-35% de B em 5 min	
15	5-15% de B em 15 min; 15-19% de B em 35 min; 19-22% de B em 30 min; 22-35% de B em 5 min	
Otim.: Otimização		

Por conseguinte, foi utilizada outra coluna cromatográfica de mesma fase estacionária ( $C_{18}$ ), dimensões e tamanho de partícula (250 x 4,6 mm, dp 5  $\mu$ m), porém com diferente característica de partícula; ou seja, a resolução da coluna  $C_{18}$  LUNA<sup>®</sup> (que vinha sendo usada) foi comparada a de uma coluna  $C_{18}$  Kinetex<sup>®</sup>, para a separação dos compostos da amostra **02IV**. Na Figura 8 (A e B) está mostrada a comparação entre os cromatogramas obtidos com cada coluna, empregando-se a condição **12T24**: 5-15% de B em 10 min; 15-23% de B em 55 min; 23-35% de B em 5 min; 35-35% de B em 5 min; 35-5% de B em 10 min; temperatura da coluna a 24 °C.

**Figura 8:** Comparação da eficiência de separação das colunas  $C_{18}$  LUNA<sup>®</sup> (A) e  $C_{18}$  Kinetex<sup>®</sup> (B), utilizando a condição **12T24** e detecção até 70 min em 254 nm.





Nestes experimentos, as duas colunas (C<sub>18</sub> LUNA<sup>®</sup> e C<sub>18</sub> Kinetex<sup>®</sup>) diferem em dois pontos principais. O primeiro está relacionado ao tempo de uso delas, sendo que a coluna LUNA<sup>®</sup> possui um maior tempo de uso, pois já havia sido utilizada na análise de diversas outras amostras vegetais por outros alunos do nosso grupo de pesquisa. O segundo se refere ao tipo de partícula na qual a fase estacionária está ligada: a LUNA<sup>®</sup> possui partículas a base de sílica totalmente porosas; enquanto que a Kinetex<sup>®</sup> possui partículas a base de sílica superficialmente porosas [141, 149]. Provavelmente, estes dois fatores, tempo de uso da coluna e característica das partículas do suporte, são os responsáveis pelas diferenças observadas entre os cromatogramas mostrados na Figura 8 (A e B).

Além disso, foi observado uma melhora significativa na resolução cromatográfica empregando-se a coluna de fase estacionária C<sub>18</sub> Kinetex<sup>®</sup> (cromatograma B, Figura 8), bem como a redução do tempo de análise sem perda de informações importantes, visto que a maioria dos compostos, que absorvem radiação no comprimento de onda utilizado, eluem em um tempo relativamente menor nesta nova coluna.

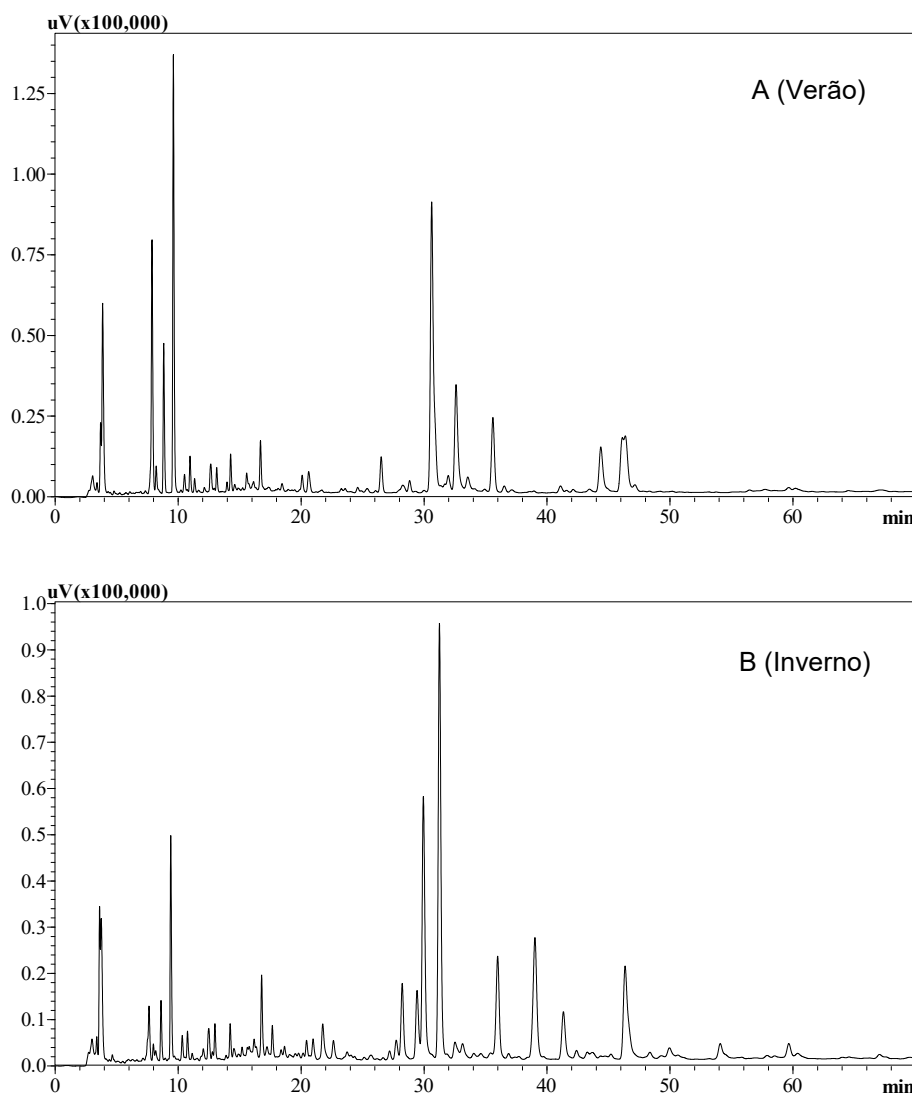
As colunas cromatográficas com partículas do suporte da fase estacionária superficialmente porosa (ou de núcleo fundido) possibilitam análises mais rápidas do que aquelas utilizando colunas com partículas totalmente porosas devido ao menor tempo de transferência de massa decorrente da camada porosa mais fina sobre um núcleo sólido fundido das partículas superficialmente porosas, apresentando menor caminho para transferências de massa quando comparadas as totalmente porosas [150]. Diante disso, as análises seguintes foram efetuadas utilizando-se a coluna C<sub>18</sub> Kinetex<sup>®</sup>.

Até este momento as otimizações foram realizadas utilizando-se o extrato aquoso (chá preparado na forma de infusão) das folhas coletadas no verão do acesso 02 (**02IV**).

Entretanto, tendo em vista que a composição química de extratos vegetais pode variar a depender da época de coleta (sazonalidade) [9, 15], verificou-se a complexidade dos extratos do acesso 02 preparada a partir da

infusão das folhas coletadas no inverno (**02II**) frente àquele obtido no verão (**02IV**). O objetivo desta análise foi avaliar se a estação do ano (verão e inverno) influenciou na complexidade química desse acesso e, ao mesmo tempo, verificar a viabilidade da aplicação do método cromatográfico desenvolvido, até então, às demais amostras sem a necessidade de modificações adicionais. A Figura 9 mostra a comparação entre os extratos obtidos a partir do acesso 02 nas duas épocas de coleta, designados por **02IV** (coletado no verão) e **02II** (coletado no inverno), utilizando a condição **12T24**.

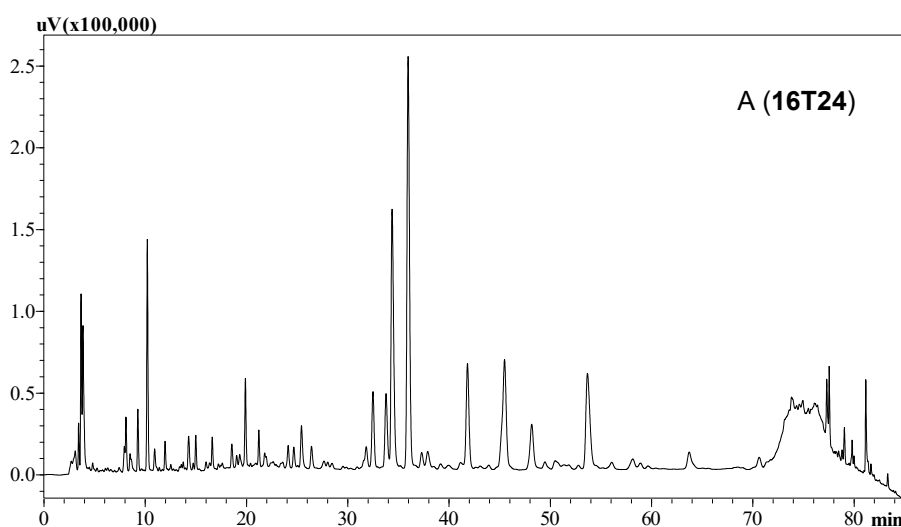
**Figura 9:** Comparação entre os cromatogramas dos extratos obtidos a partir do acesso LA02 nas duas épocas de coleta: (A) **02IV** e (B) **02II**, aplicando-se a condição **12T24** e detecção até 70 min em 254 nm.

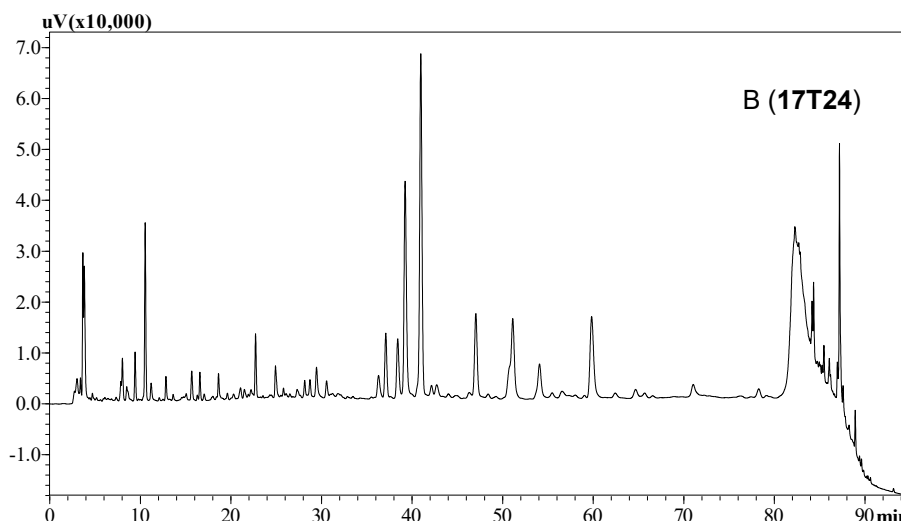


Considerando os cromatogramas da Figura 9, a amostra de infusão da coleta de inverno (cromatograma B) mostrou-se mais complexa devido ao maior número de bandas observadas, das quais algumas podem ser resultantes de coeluição, pois percebe-se que as bandas na região em torno de 30 minutos estão pouco resolvidas enquanto àquelas entre os tempos de retenção de 36 a 48 minutos estão levemente alargadas. Assim, devido a sua maior complexidade, o extrato **02II** foi utilizado nos experimentos adicionais para a aquisição do método.

Por consequência, houve a necessidade de novas modificações no gradiente de eluição, pois além da obtenção do perfil cromatográfico dos acessos de *L. alba* objetivou-se o isolamento e identificação dos compostos dessa espécie, utilizando-se a técnica hifenada CL-DAD-SPE/RMN, necessitando, em muitos casos, uma separação adequada entre as bandas cromatográficas. Os cromatogramas representativos da amostra **02II** obtidos a partir das novas otimizações, **16T24**: 5-15% de B em 15 min; 15-21% de B em 50 min; 21-35% de B em 5 min; 35-100% de B em 10 min e **17T24**: 5-15% de B em 20 min; 15-21% de B em 55 min; 21-100% de B em 10 min; 100-100% de B em 10 min, estão mostrados na Figura 10 (A e B).

**Figura 10:** Otimizações cromatográficas: (A) **16T24** (registrado até 85 min) e (B) **17T24** (registrado até 95 min), mantendo-se a temperatura da coluna a 24 °C e detecção em 254 nm.

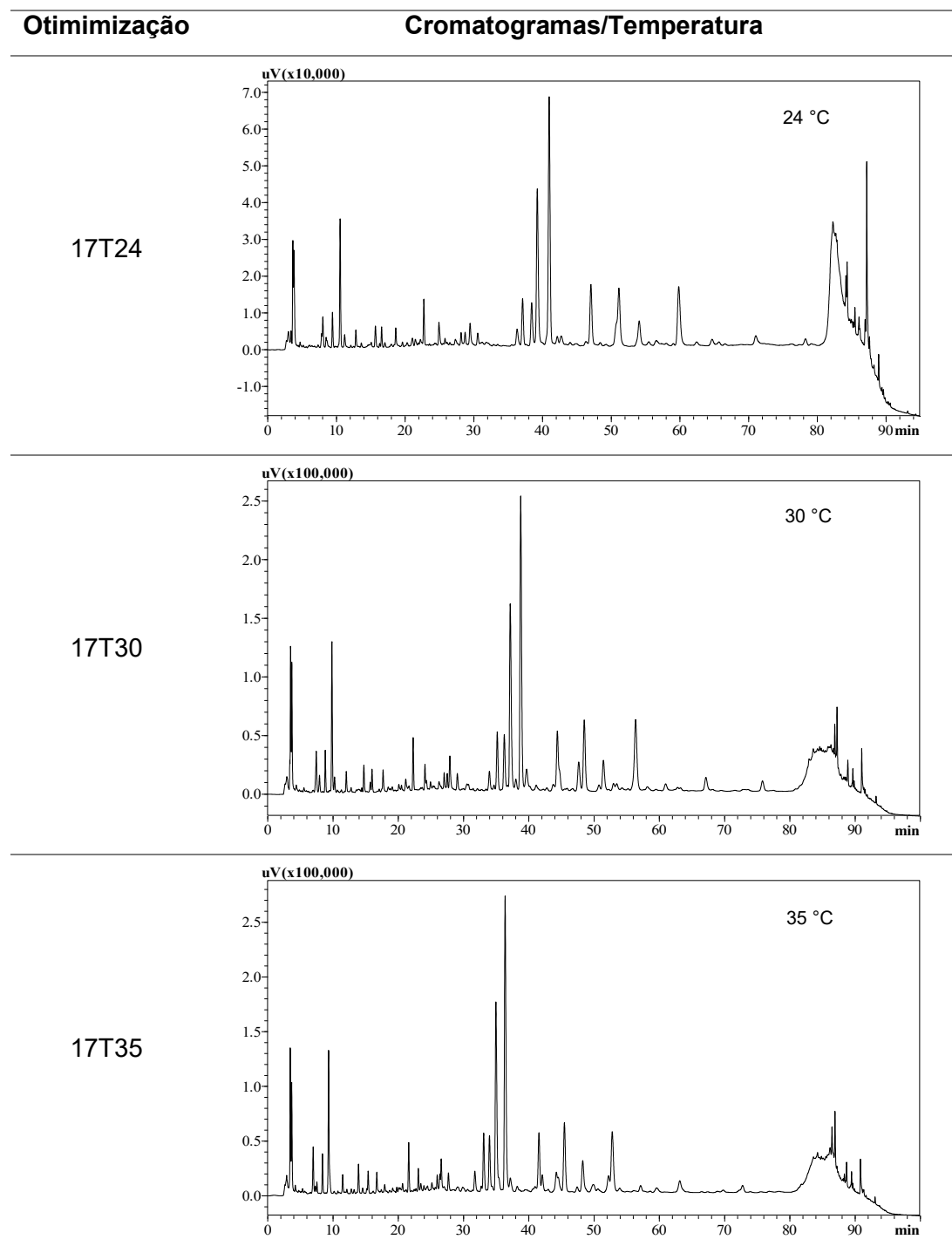




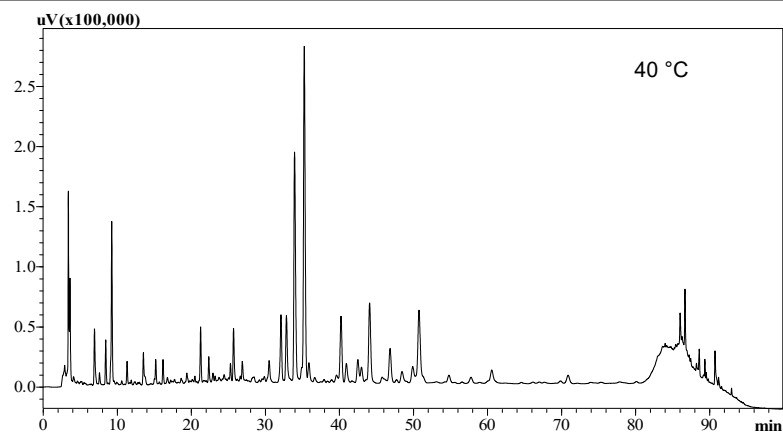
Como consequência das otimizações, uma nova e melhor condição foi encontrada e identificada como condição **17T24** (cromatograma B, Figura 10), a qual resultou em uma melhor separação das bandas cromatográficas em comparação com as condições **12T24** (Figura 9B) e **16T24** (Figura 10A). No entanto, ainda observa-se bandas alargadas que, supostamente, podem ser constituídas por compostos que estão em coeluição (Figura 10, cromatograma B, no intervalo de tempo de retenção entre 46 e 60 minutos).

Portanto, verificou-se, novamente, o efeito da temperatura sob a separação dos compostos presentes nesta nova amostra (**02II**) utilizando a coluna C<sub>18</sub> Kinetex<sup>®</sup>. Para isso, foram testadas as seguintes temperaturas: 24 (já verificada), 30, 35, 40, 45 e 50 °C, usando o mesmo gradiente de separação (otimização **17**: 5-15% de B em 20 min; 15-21% de B em 55 min; 21-100% de B em 10 min), com pequenas variações na parte da limpeza da coluna (mantendo-se 100% de B durante um determinado tempo), o que justifica algumas mudanças no tempo final entre algumas análises, porém sem perda de informações relevantes. Os resultados destes testes estão apresentados na Figura 11.

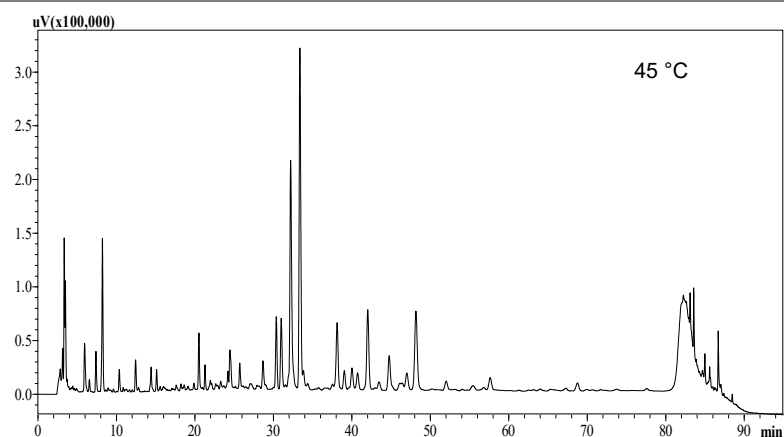
**Figura 11:** Efeito da temperatura da coluna (24 a 50 °C) na separação cromatográfica do extrato **02II** empregando-se a otimização **17** e detecção em 254 nm.



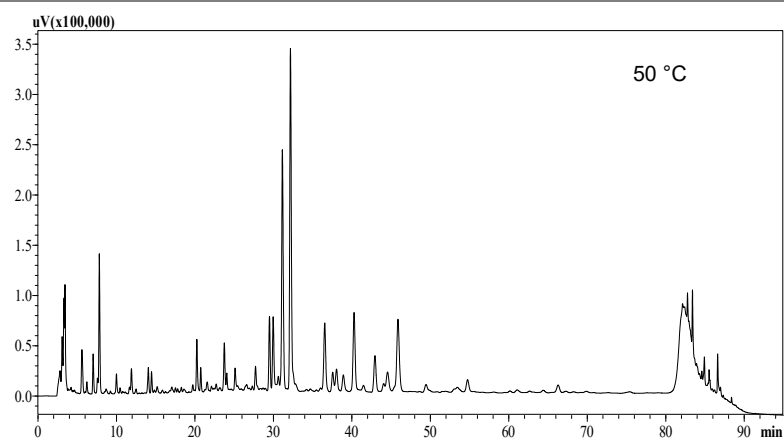
17T40



17T45



17T50



Como pode ser visto na Figura 11, mantendo-se a temperatura da coluna em 45 °C obteve-se um melhor perfil cromatográfico (condição **17T45**), em que se observou, principalmente, uma melhoria na separação das bandas que eluíam em torno de 39 minutos e daquelas sobrepostas entre 46 e 60 min, confirmando que o alargamento das bandas foi causado pela coeluição de alguns compostos, como mostrado anteriormente no cromatograma da condição **17T24** (com temperatura da coluna a 24 °C) em que se pode

visualizar as bandas alargadas. Portanto, nas análises cromatográficas posteriores a temperatura da coluna será mantida a 45 °C.

Considerando que preparações a base de plantas medicinais são de extrema complexidade química, o sucesso de um *fingerprint* cromatográfico depende fortemente do grau de separação entre estes compostos. Por consequência, a análise cromatográfica de tais preparações não é trivial, sendo necessário o desenvolvimento de um método de separação, muitas vezes, específico para cada tipo de amostra [56, 64], o que justifica a avaliação dos vários parâmetros durante as análises previamente realizadas para o desenvolvimento de um método cromatográfico mais adequado para as amostras estudadas.

As análises realizadas até este momento foram feitas em um cromatógrafo líquido **semi-preparativo** (descrito na seção 3.2), pois o cromatógrafo líquido **analítico** apresentava-se com problemas.

#### 4.2.2 *Análises cromatográficas no sistema analítico*

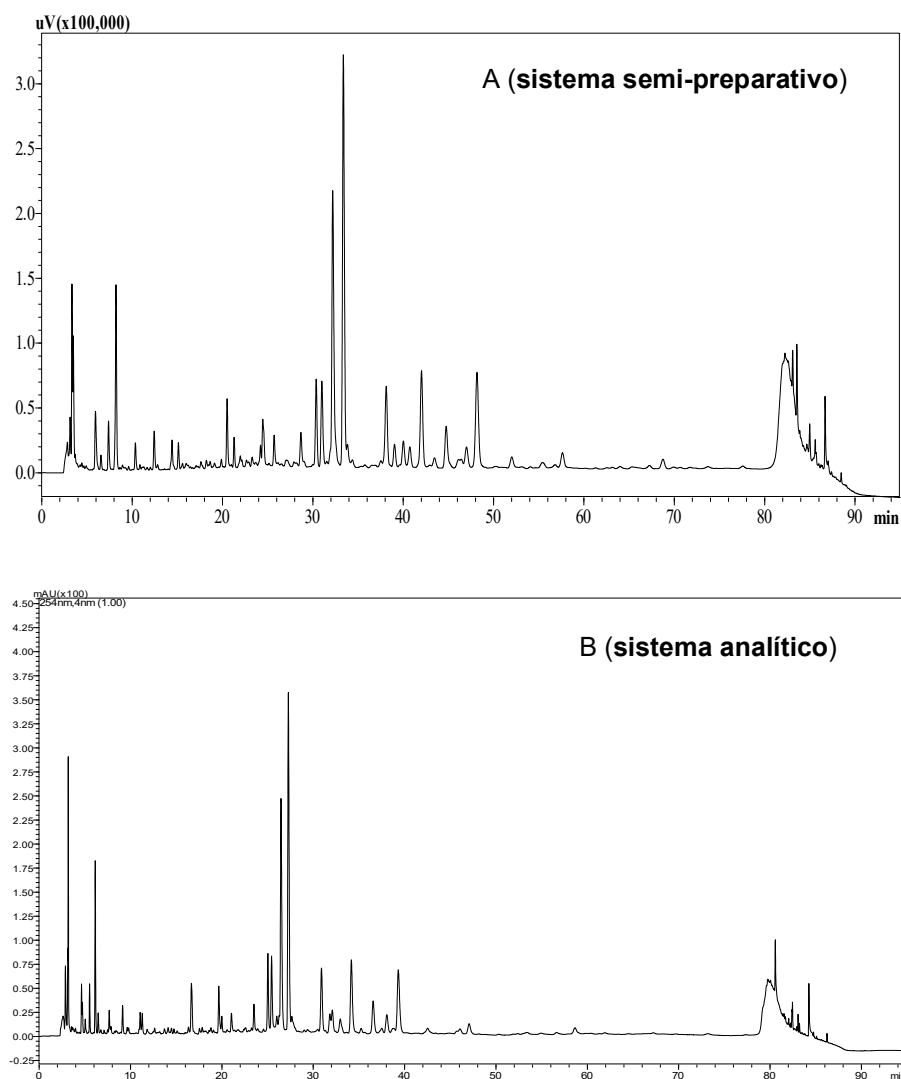
A parte final do desenvolvimento do método foi realizada em um cromatógrafo líquido analítico Shimadzu (Quioto, Japão) modelo Prominence (**sistema analítico**, seção 3.2). O **sistema analítico**, em comparação ao **semi-preparativo**, apresenta como principal vantagem está configurado com um detector de arranjo de diodos (DAD).

O detector DAD permite a observação do espectro UV-VIS dos compostos presentes na amostra, que absorvem radiação nessa região do espectro eletromagnético [115, 117]. Adicionalmente, fazendo uso do DAD, pode-se estudar, em uma única análise cromatográfica, qual comprimento de onda é o mais adequado para a detecção dos compostos presentes em uma amostra, desde que estes compostos absorvam radiação na região UV-VIS [54].

A Figura 12 mostra os cromatogramas obtidos no **sistema semi-preparativo** (A) e no **sistema analítico** (B), utilizando-se a condição **17T45: 5-**

15% de B em 20 min; 15-21% de B em 55 min; 21-100% de B em 10 min; 100-100% de B em 10 min; temperatura da coluna de 45 °C e vazão de 1,0 mL/min.

**Figura 12:** Comparação entre os cromatogramas obtidos no sistema: **semi-preparativo** (A) e **analítico** (B), empregando-se a condição **17T45**, em 254 nm.



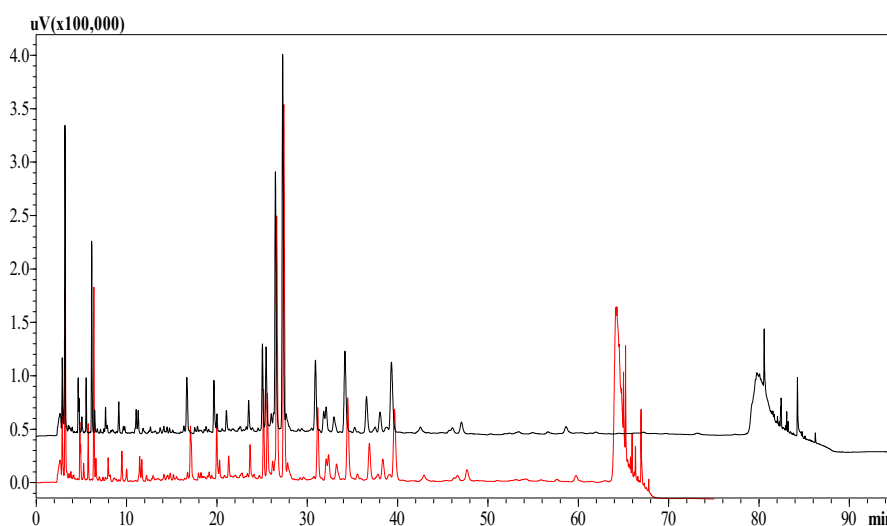
A diferença na unidade de resposta do detector entre os dois cromatogramas na Figura 12 (eixo vertical) se deve as diferentes configurações entre os dois sistemas, no que se refere a unidade a ser utilizada para esta medida no momento da aquisição dos dados (**semi-preparativo** em  $\mu\text{V}$  e **analítico** em mAU); fato que não interfere expressivamente na comparação dos resultados (cromatograma A e cromatograma B).



No entanto, quando se utilizou o **sistema analítico** (cromatograma B) foi observado que os compostos que caracterizam a amostra eluem em um tempo de análise relativamente menor do que no sistema **semi-preparativo** (cromatograma A), fato que pode ser atribuído às diferenças existentes entre os dois sistemas como tipo das bombas e comprimento e volume de conexões e tubulações.

Dando continuidade as otimizações, com o intuito de reduzir o tempo de análise sem comprometer a separação dos compostos (utilizando o **sistema analítico**), a parte final do gradiente **17** foi levemente modificada dando origem a condição **18T45**: 5-15% de B em 20 min; 15-19% de B em 40 min; 19-100% de B em 5 min; 100-100% de B em 10 min; temperatura da coluna a 45 °C. O cromatograma obtido com a condição **18T45** sobreposto àquele da condição **17T45** pode ser observado na Figura 13.

**Figura 13:** Comparação entre os cromatogramas obtidos no **sistema analítico**, empregando-se a condição: **17T45** (preto) e **18T45** (vermelho), com vazão de 1,0 mL/min, em 254 nm.

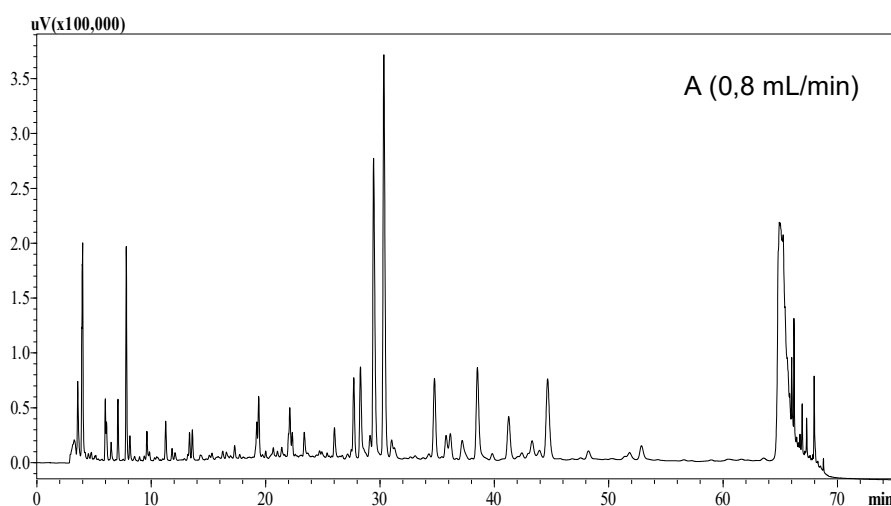


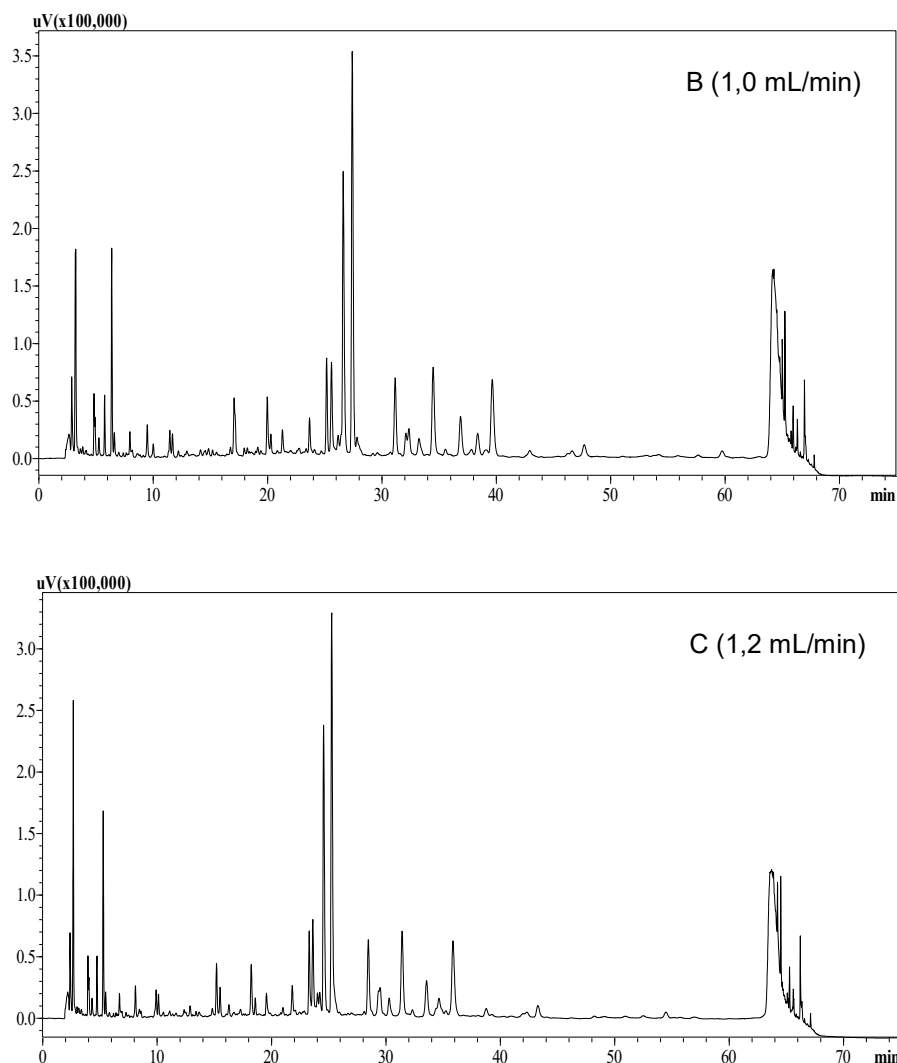
Analisando-se a Figura 13, pode se observar que a condição **18T45** (cromatograma em vermelho), permitiu uma redução de aproximadamente 20 min do tempo de análise total e, por consequência, diminuição do volume total de solvente orgânico a ser utilizado sem prejudicar a separação

cromatográfica. Assim sendo, a condição **18T45** será empregada para a obtenção dos *fingerprints* cromatográficos dos extratos de *L. alba*.

De forma geral, para determinada condição de análise cromatográfica, existe uma vazão em que a eficiência cromatográfica atinge seu valor máximo. Tal situação depende de diversas variáveis como comprimento da coluna, diâmetro de partícula, temperatura da coluna e tipo de compostos da amostra [53]. Portanto, foram testadas, adicionalmente, vazões de 0,8 e 1,2 mL/min para comparação com o último resultado obtido, em que foi utilizada a vazão da fase móvel de 1,0 mL/min (condição **18T45**), mantendo-se, no entanto, a temperatura da coluna a 45 °C, como mostra a Figura 14.

**Figura 14:** Comparação entre os cromatogramas obtidos no **sistema analítico**, empregando-se o gradiente de eluição **18**: 5-15% de B em 20 min; 15-19% de B em 40 min; 19-100% de B em 5 min; 100-100% de B em 10 min, com vazão da fase de: 0,8 mL/min (A); 1,0 mL/min (B) e 1,2 mL/min (C), mantendo-se a temperatura da coluna em 45 °C e detecção a 254 nm.



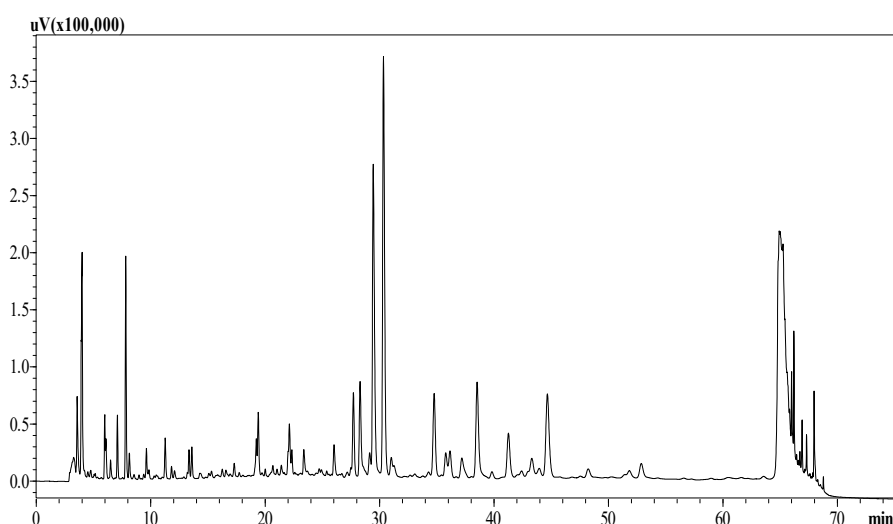


Através dos cromatogramas mostrados na Figura 14 foi observado que empregando-se uma vazão de 0,8 mL/min houve uma melhor separação entre algumas bandas em comparação com aqueles nas demais vazões testadas. Além disso, nesta vazão há uma diminuição do volume total de solvente orgânico utilizado durante a análise, bem como uma redução da pressão gerada no sistema cromatográfico, pois quando utiliza-se o mesmo equipamento e as mesmas condições de análise sabe-se que quanto menor a vazão da fase móvel menor a pressão do sistema, diminuindo o seu desgaste [147, 148]. Por consequência, a vazão de 0,8 mL/min foi a escolhida para a obtenção dos *fingerprints* cromatográficos dos diferentes acessos de *L. alba*.

Por fim, após as etapas de otimização de análise, foi obtido o melhor *fingerprint* cromatográfico empregando-se as seguintes condições: coluna Kinetex C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex), acoplada a uma coluna

guarda de mesma fase estacionária, aquecidas a 45 °C; volume de injeção da amostra de 25 µL; fase móvel constituída por uma mistura binária de ACN (B) e uma solução aquosa de ácido fórmico (HCOOH) 0,5% (v/v) (A) a uma vazão de 0,8 mL/min. O gradiente de eluição utilizado foi o **18**: 5-15% de B em 20 min; 15-19% de B em 40 min; 19-100% de B em 5 min; isocrático em 100% de B durante 10 min; retornando para a condição inicial variando de 100 a 5% de B em 5 min. O tempo de acondicionamento da coluna foi de 55 minutos mantendo-se 5% de B. Na Figura 15 está mostrado o cromatograma obtido da amostra **02II** utilizando estas condições.

**Figura 15:** Cromatograma obtido empregando-se a condição **18T45** com vazão de 0,8 mL/min e detecção em 254 nm.

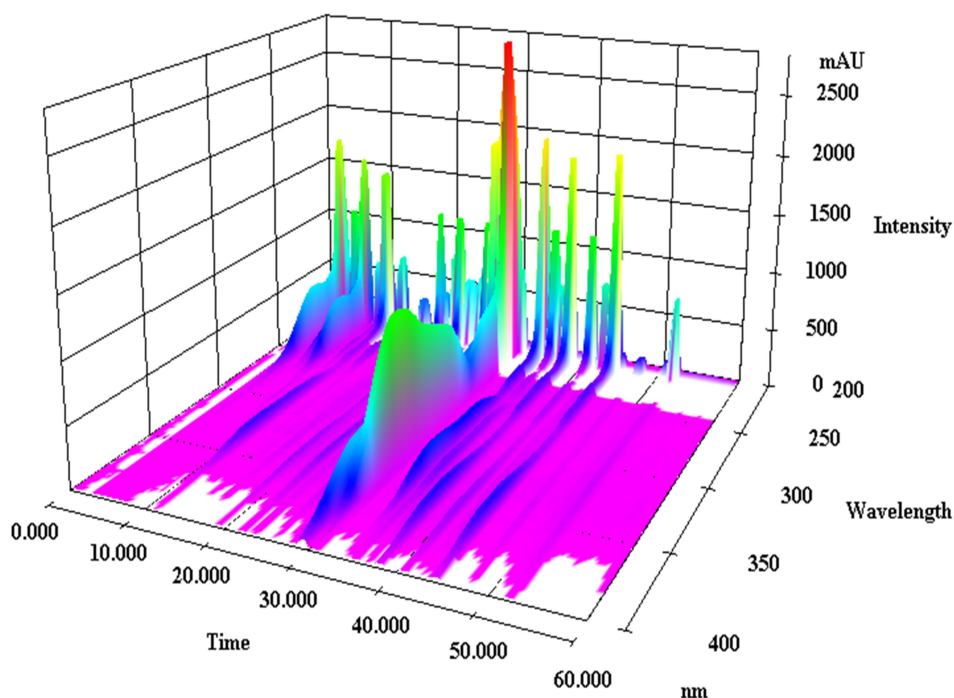


Neste trabalho optou-se por analisar as diferenças entre os acessos de *L. alba* com base nos compostos mais polares presentes em seus extratos, excluindo os compostos que não puderam ser separados e eluem após 60 minutos de análise, como mostra o cromatograma da Figura 15. Desta forma, nas análises posteriores o monitoramento das bandas cromatográficas será realizado apenas até 60 minutos de análise. Assim, os dados que serão submetidos à análise quimiométrica são aqueles adquiridos até 60 minutos de corrida cromatográfica.

Após a obtenção do método cromatográfico foi avaliado, através da projeção tridimensional (absorbância vs comprimento de onda vs tempo de retenção) por CL-DAD, qual o comprimento de onda (entre 200 e 400 nm) seria

o mais adequado para a detecção de um maior número de bandas cromatográficas referentes a amostra **02II** (Figura 16).

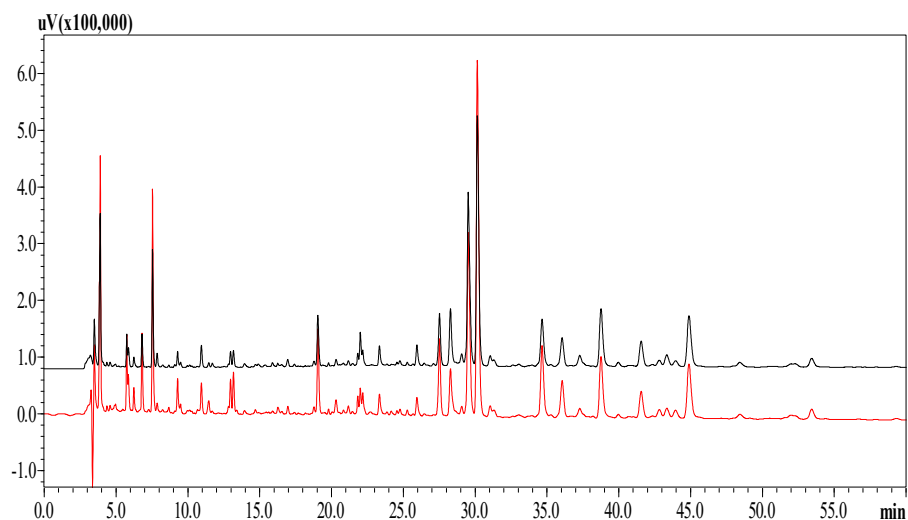
**Figura 16:** Cromatograma 3D (entre 200 e 400 nm) do extrato **02II** utilizando a condição **18T45**, com vazão de 0,8 mL/min e detecção até 60 minutos.



De modo geral, um *fingerprint* cromatográfico caracteriza-se por apresentar a maior quantidade de informações possíveis, ou seja, o maior número de bandas detectáveis, com maior resolução, menor tempo de análise e boa estabilidade de linha de base [14, 57].

Assim, analisando-se a Figura 16 pode se observar que a utilização dos comprimentos de onda de 254 e 240 nm permitiu a visualização de cromatogramas com maior número de bandas associadas à maiores intensidades. A Figura 17 mostra a comparação entre os cromatogramas obtidos utilizando-se esses dois comprimentos de onda (254 e 240 nm).

**Figura 17:** Comparação entre os cromatogramas obtidos utilizando o comprimento de onda de 254 nm (preto) e 240 nm (vermelho), empregando-se a condição **18T45** e vazão de 0,8 mL/min.

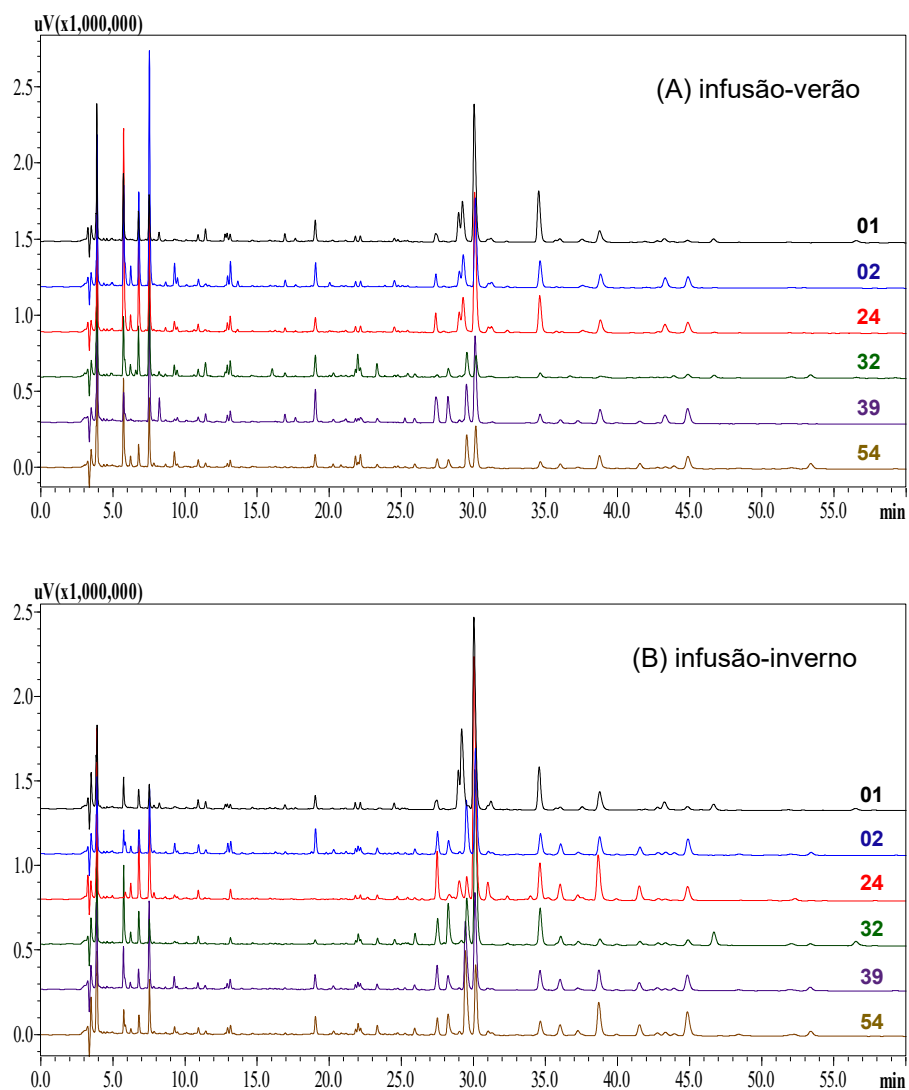


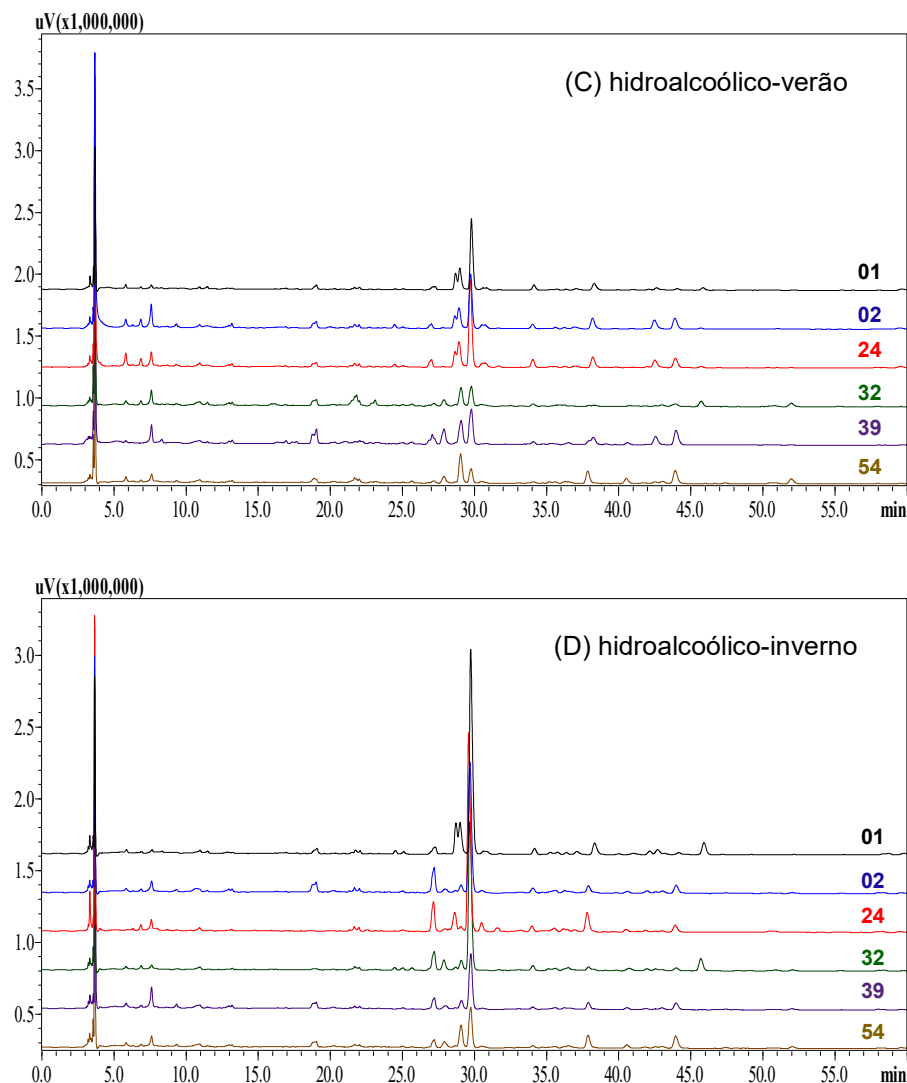
Baseando-se nos resultados apresentados na Figura 17, o comprimento de onda de 240 nm possibilitou a obtenção de um cromatograma com bandas de maiores intensidades em comparação com aquele obtido empregando-se o comprimento de onda de detecção de 254 nm e, portanto, foi selecionado para a obtenção dos *fingerprints* cromatográficos da espécie estudada.

#### 4.2.3 Aquisição dos *fingerprints* cromatográficos dos extratos de *L. alba*

Para comparar os perfis cromatográficos dos extratos obtidos a partir das folhas de *L. alba* (seis acessos diferentes: 01, 02, 24, 32, 39 e 54) de diferentes épocas de coleta (verão e inverno) e preparadas de formas distintas (infusão e maceração), a melhor condição cromatográfica (condição **18T45**) foi utilizada para gerar todos os cromatogramas *fingerprints*, com detecção em 240 nm, para posteriormente analisá-los por quimiometria. Os cromatogramas obtidos nestas condições estão mostrados na Figura 18.

**Figura 18:** Cromatogramas *fingerprint* dos extratos de *L. alba* (seis acessos diferentes, 01, 02, 24, 32, 39 e 54), preparadas de formas distintas e de épocas de coleta diferentes: (A) infusão-verão, (B) infusão-inverno, (C) hidroalcoólico-verão e (D) hidroalcoólico-inverno, empregando-se a condição **18T45** e detecção em 240 nm.





Como se pode observar na Figura 18, há algumas diferenças entre os cromatogramas dos extratos analisados, especialmente quando são comparados os resultados entre os extratos preparados de forma distintas, como na comparação entre os cromatogramas A e C, ou entre os cromatogramas B e D entre si. No entanto, somente após a análise quimiométrica poderão ser visualizadas com mais clareza as diferenças e semelhanças químicas encontradas entre estes extratos e relacioná-las às bandas presentes nos cromatogramas.

Baseando-se nos resultados apresentados na Figura 18, o método desenvolvido se mostrou apropriado para a obtenção do perfil cromatográfico de todos os extratos, visto que permitiu a obtenção de perfis cromatográficos

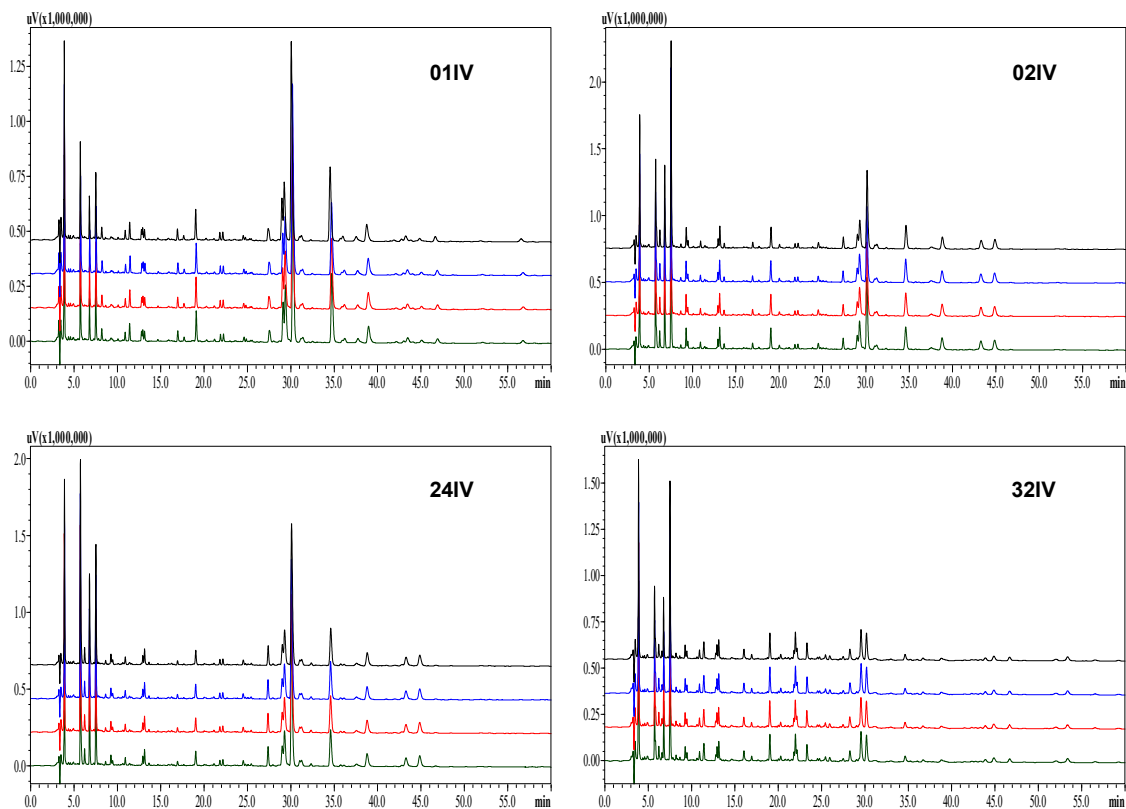


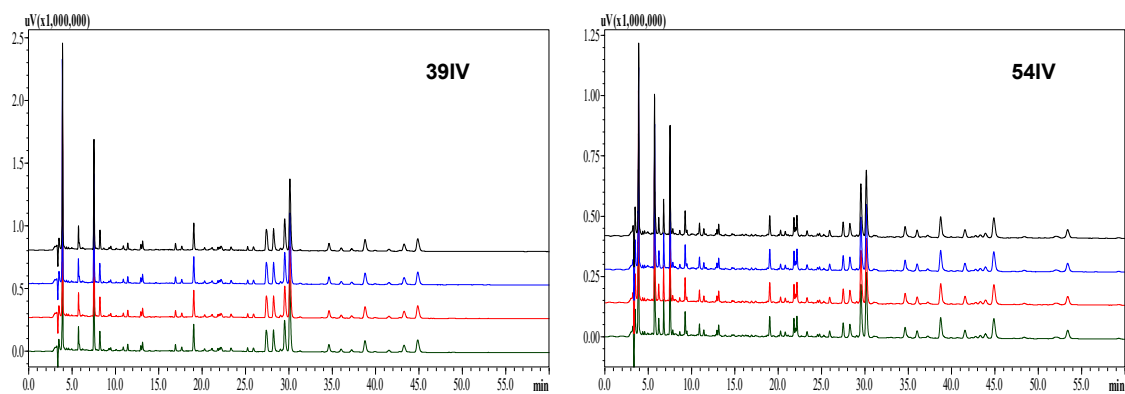
com boa separação entre as bandas, fornecendo uma boa representação do perfil químico de cada extrato.

Contudo, embora não seja o objetivo deste trabalho validar o método cromatográfico desenvolvido, a análise de cada extrato foi realizada em quadruplicata de forma a avaliar a repetitividade da metodologia desenvolvida, que é uma das maneiras de se verificar a precisão de um método de separação, representando a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medida. Além disso, a repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações, sendo denominada, algumas vezes, por precisão intra-ensaio ou intra-corrida [151].

Na Figura 19 estão mostradas as quadruplicatas dos cromatogramas das amostras de infusão da coleta de verão.

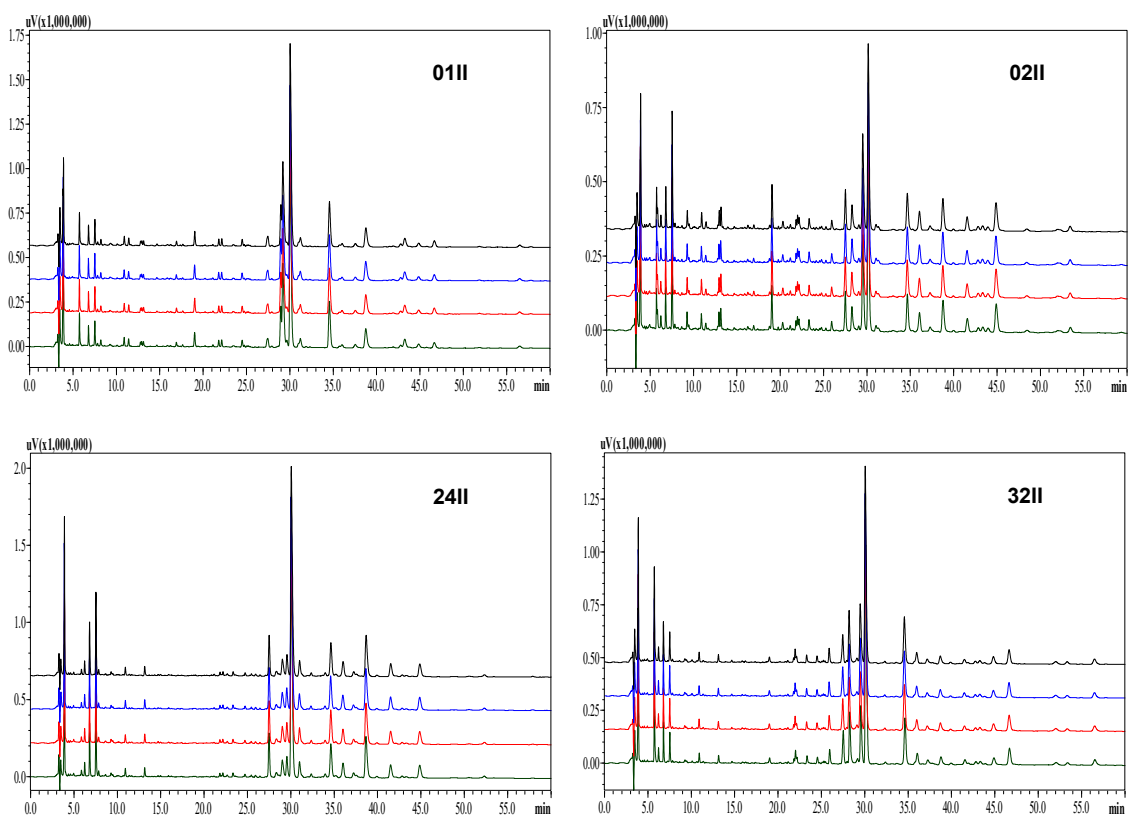
**Figura 19:** Cromatogramas em quadruplicata obtidos das amostras de infusão da coleta de verão (IV) dos seis acessos de *L. alba*.

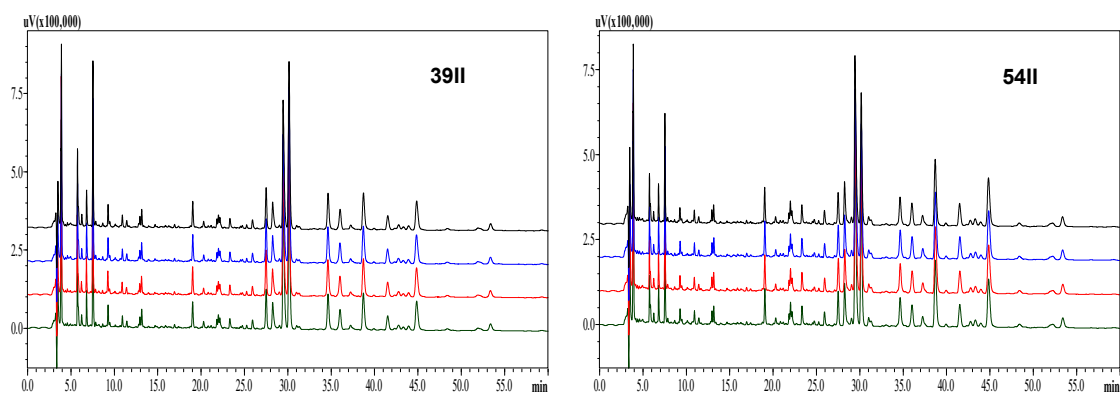




Na Figura 20 estão mostradas as quadruplicatas dos cromatogramas das amostras de infusão da coleta de inverno.

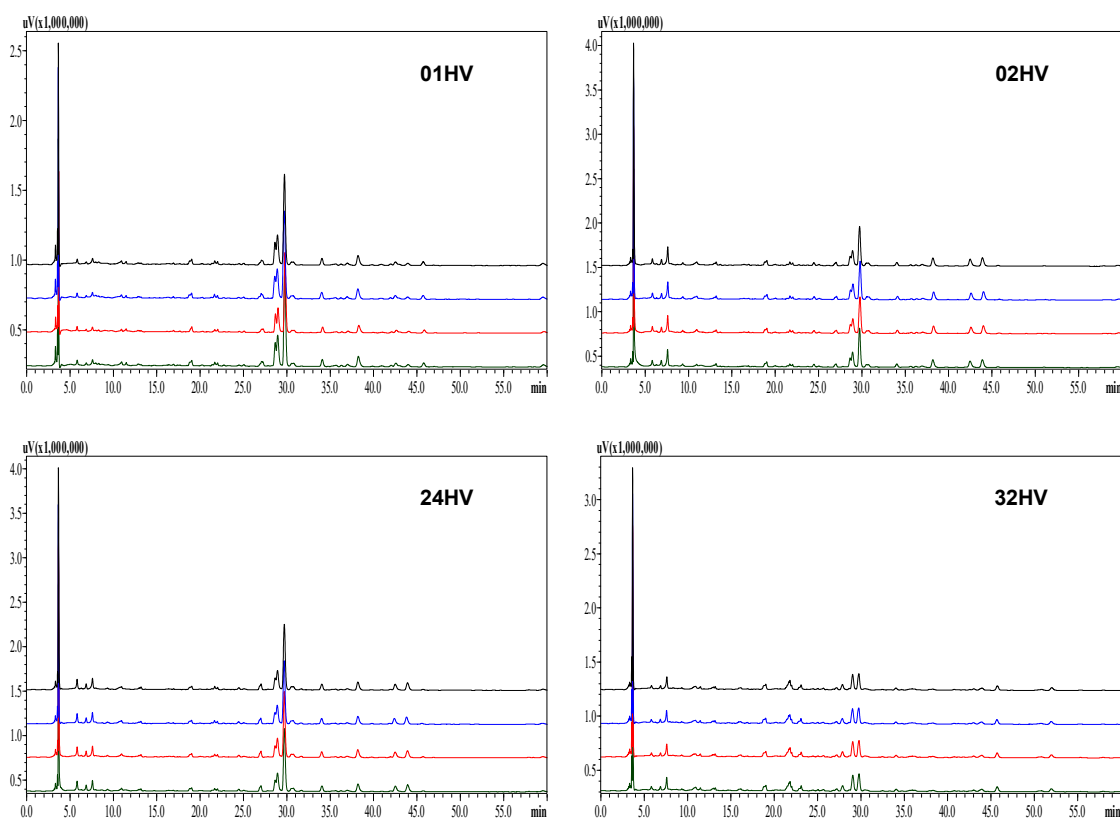
**Figura 20:** Cromatogramas em quadruplicata obtidos das amostras de infusão da coleta de inverno (II) dos seis acessos de *L. alba*.

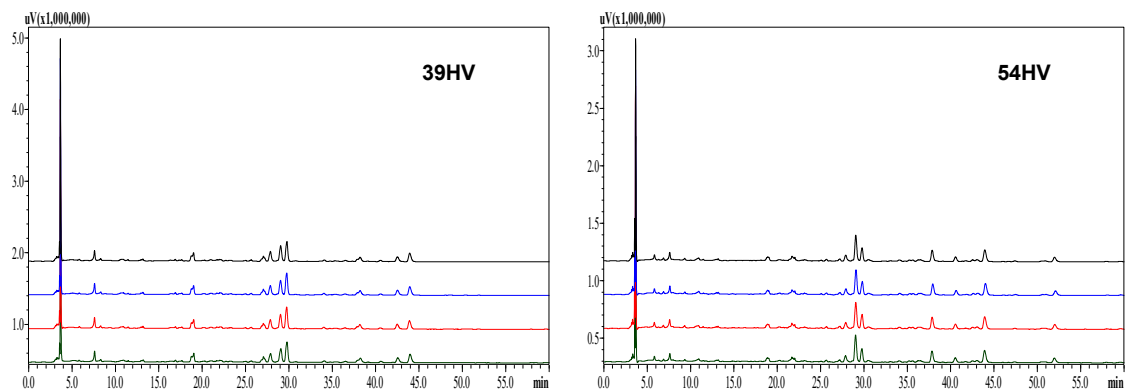




A Figura 21 mostra os cromatogramas obtidos em quadruplicata das amostras hidroalcoólicas da coleta de verão.

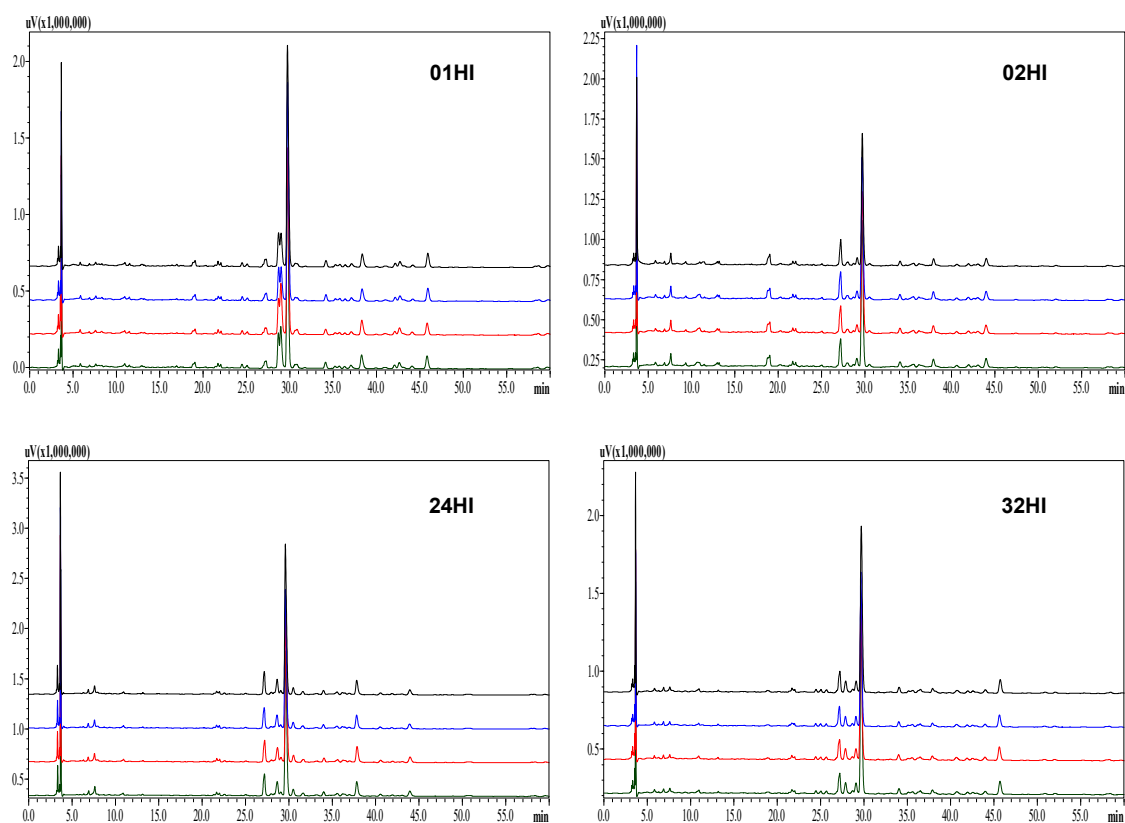
**Figura 21:** Cromatogramas em quadruplicata obtidos das amostras hidroalcoólicas da coleta de verão (HV) dos seis acessos de *L. alba*.

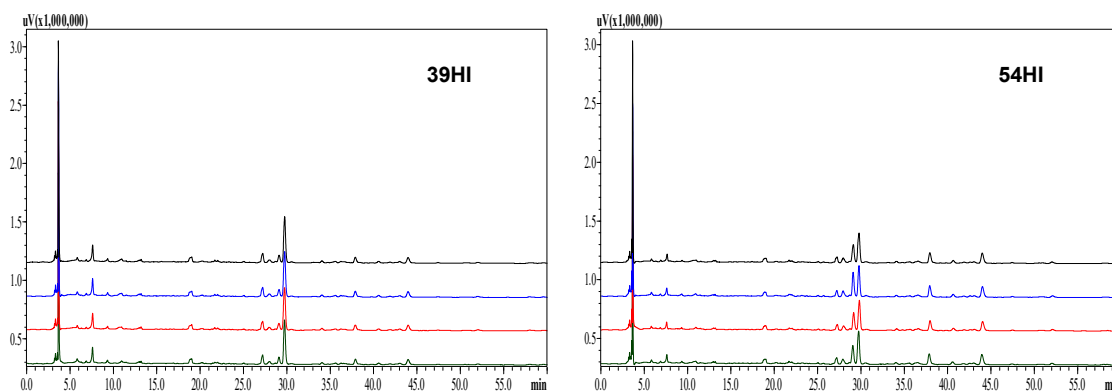




A Figura 22 mostra os cromatogramas obtidos em quadruplicata das amostras hidroalcoólicas da coleta de inverno.

**Figura 22:** Cromatogramas em quadruplicata obtidos das amostras hidroalcoólicas da coleta de inverno (HI) dos seis acessos de *L. alba*.





Através dos cromatogramas mostrados nas Figuras 19 a 22, pode-se perceber que o método apresentou uma boa repetitividade, uma vez que as quadruplicatas de cada extrato apresentaram grandes similaridades. Após esta etapa os dados foram reunidos e enviados para a análise quimiométrica.

#### 4.3 Análise Quimiométrica: Análise de Componentes Principais (PCA)

Através dos *fingerprints* cromatográficos das amostras de *L. alba* (Figura 18) foi possível observar algumas diferenças e semelhanças entre os acessos e amostras estudadas, porém difíceis de serem interpretadas visualmente.

Portanto, a utilização da PCA torna-se de fundamental importância, uma vez que essa técnica tem por finalidade reduzir a dimensionalidade dos dados sem perda de informações relevantes, permitindo a visualização e interpretação de dados complexos de forma mais eficiente [66, 136, 152].

Na PCA, um determinado conjunto de dados brutos é projetado em um novo sistema de eixos, com menor número de coordenadas (novas variáveis não correlacionadas), denominadas componentes principais (PC's), que são combinações lineares das variáveis originais. Essa estratégia possibilita a verificação da existência de correlações (agrupamentos) entre amostras, bem como a discriminação entre elas através do gráfico de *scores*, podendo fornecer informações sobre quais propriedades (variáveis) destas amostras são responsáveis pelas correlações ou diferenças entre elas através da análise

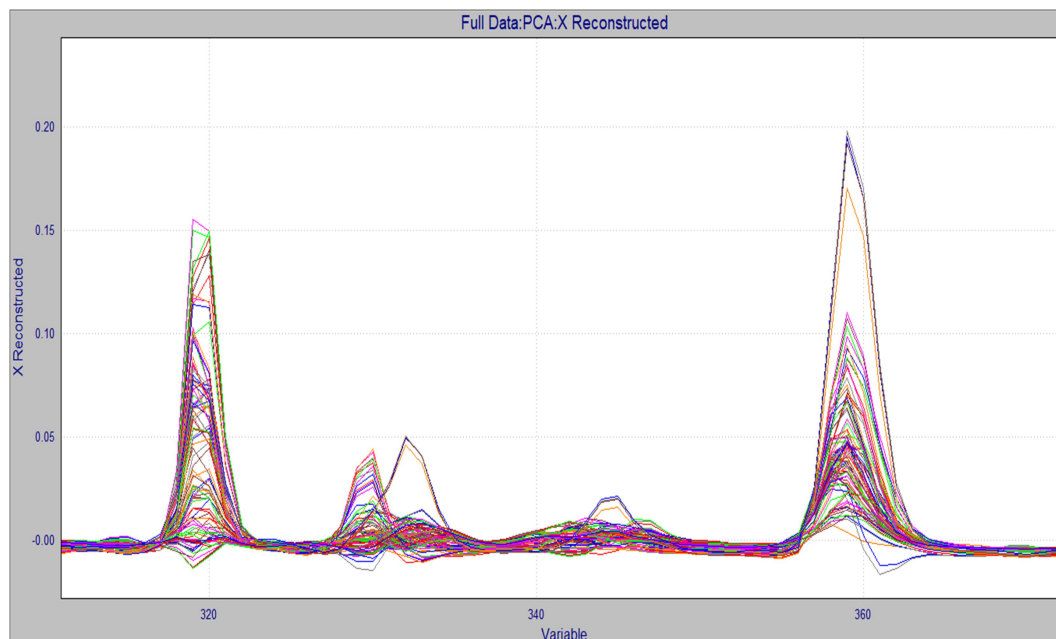
combinada dos gráficos de *scores* e *loadings*, que trazem, respectivamente, informações sobre as amostras e variáveis [15, 60, 68, 137, 138].

Antes de submeter os dados à PCA se faz necessário uma etapa de pré-tratamento e pré-processamento dos dados, para que se possa garantir a eficiência da análise multivariada. Os principais objetivos da aplicação das técnicas de pré-tratamento e pré-processamento são eliminar informações não relevantes e tornar a matriz de dados melhor condicionada para a análise. Os métodos de pré-processamento mais utilizados consistem em centrar os dados na média ou autoescalar os mesmos [66, 69, 153].

No presente trabalho, os dados brutos obtidos a partir dos perfis cromatográficos de *L. alba* realizados em quadruplicata passaram por um pré-tratamento, utilizando o programa computacional Matlab (alinhamento dos picos pela técnica do algoritmo *Correlation Optimised Warping* - COW), e pré-processamento (centrados na média). Após estas etapas os dados foram organizados em uma matriz, contendo 96 linhas (amostras) e 563 variáveis (tempos de retenção, 60 min) e, então, submetidos à análise de componentes principais (PCA).

A Figura 23 mostra a importância do pré-tratamento dos dados, nesse caso, através do alinhamento das bandas cromatográficas para favorecer a utilização de dados que representem de forma adequada as características do conjunto de dados referente às amostras pela eliminação de prováveis interferências [15].

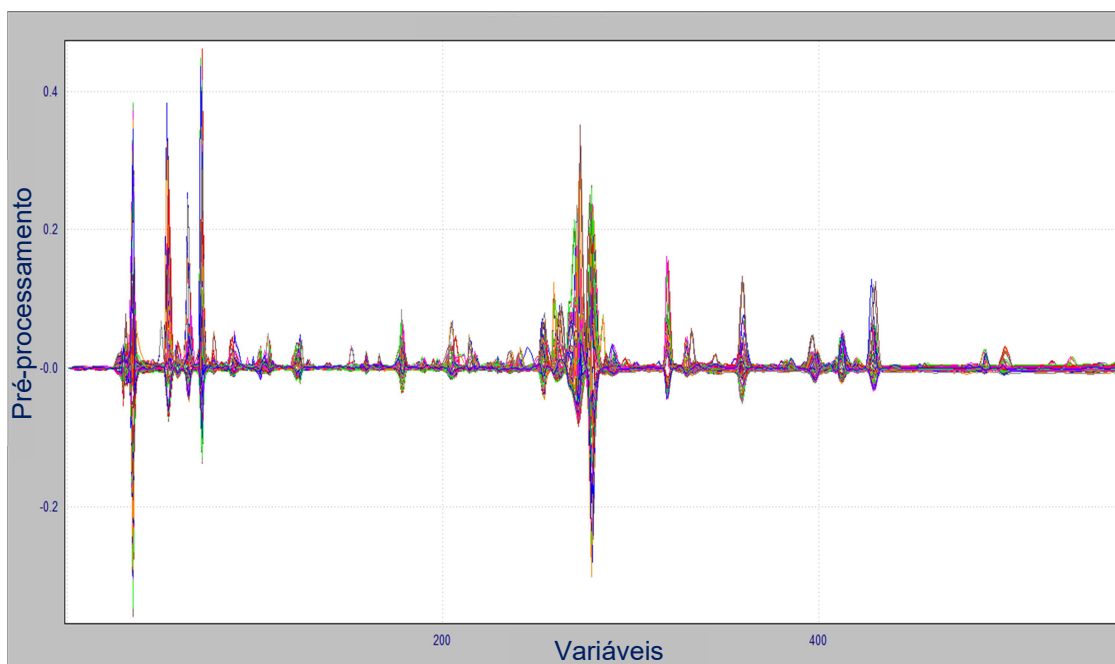
**Figura 23:** Parte do cromatograma (240 nm) dos extratos de *L. alba* após o alinhamento dos dados.



O alinhamento dos dados (tempos de retenção das bandas cromatográficas) tornou-se necessário devido a desvios mínimos nos tempos de retenção que podem ser originados por pequenas oscilações no sistema cromatográfico. A aplicação da PCA aos dados não alinhados poderia implicar em resultados e interpretações equivocadas das informações obtidas [14, 15].

Na etapa de pré-processamento, os dados adquiridos foram centrados na média, isto é, foi calculada a média dos valores experimentais para cada variável e foi subtraído cada valor experimental do respectivo valor médio. O resultado do pré-processamento dos dados está mostrado graficamente na Figura 24.

**Figura 24:** Gráfico de pré-processamento dos dados centrado na média.



Neste trabalho, a PCA foi utilizada para estudar as dissimilaridades químicas entre acessos de *L. alba* através de seus *fingerprints* cromatográficos, além de verificar o afeito da sazonalidade e do método de extração na composição química das preparações obtidas desta espécie. A Tabela 4 mostra as variâncias explicadas em percentual por cada PC obtidas através da análise quimiométrica.

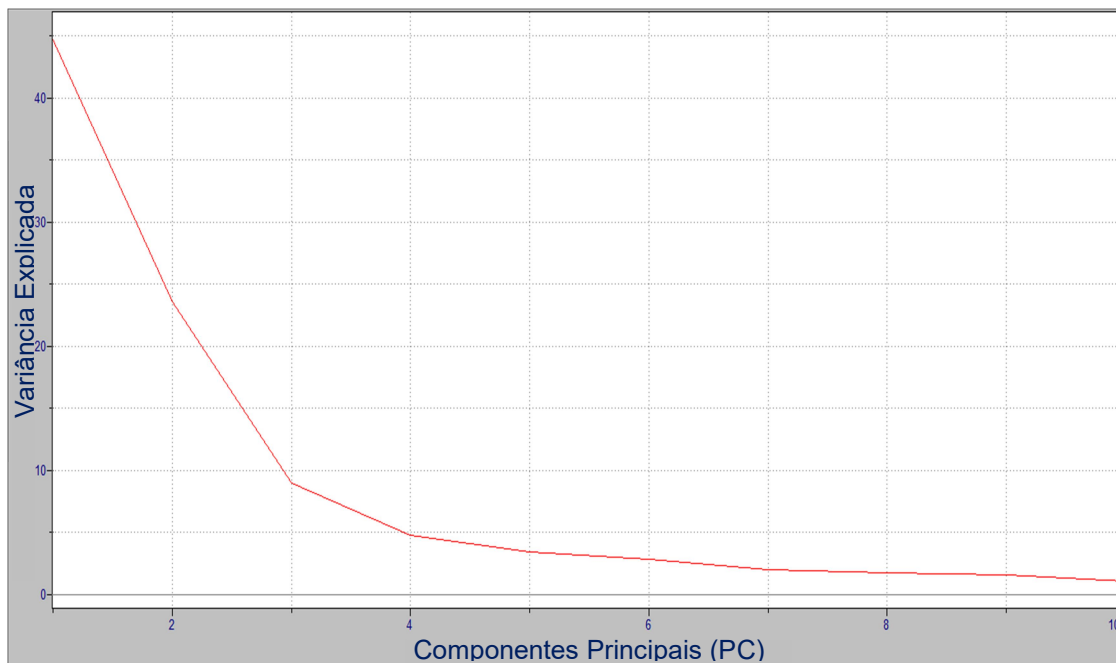
**Tabela 4:** Variância percentual das componentes principais calculadas para os dados da matriz original centrados na média.

Componente Principal	Variância explicada (%)	Variância Acumulada (%)
PC1	44,7	44,7
PC2	23,6	68,3
PC3	8,97	77,2
PC4	4,82	82,1
PC5	3,45	85,5
PC6	2,81	88,3
PC7	2,02	90,3
PC8	1,72	92,1
PC9	1,56	93,6
PC10	1,08	94,7



Na Figura 25 está mostrado graficamente os dados apresentados na Tabela 4 referentes à variância explicada por cada PC.

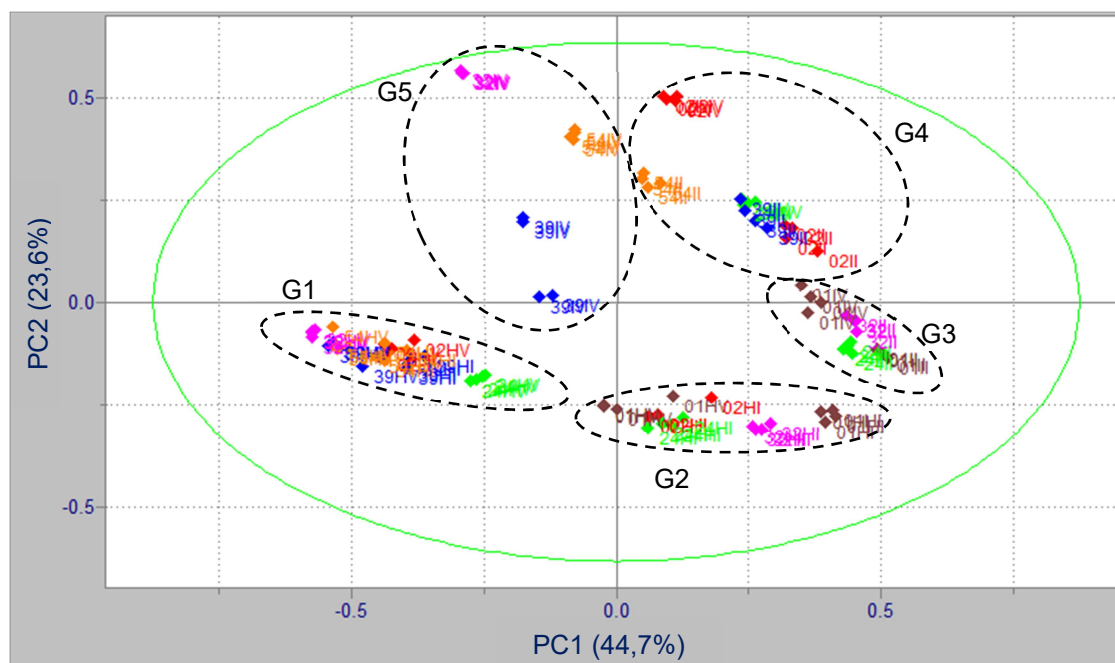
**Figura 25:** Variância explicada (%) em cada Componente Principal (PC).



Como pode ser observado (Tabela 4 e Figura 25), a PC1 e PC2 correspondem, respectivamente, a 44,7% e 23,6% da variância total dos dados, isto é, juntas descrevem 68,3% da variância total dos dados [14].

Através da PCA foi possível reduzir a dimensionalidade da matriz original de dados [de 563 para 2 (2 PCs)], os quais puderam ser projetados em duas novas coordenadas, a PC1 e PC2, facilitando a visualização e interpretação das informações significativas obtidas das amostras estudadas [14, 138]. Tais informações podem ser visualizadas através do gráfico de scores (PC1 *versus* PC2) na Figura 26.

**Figura 26:** Gráfico de scores (PC1 versus PC2) das amostras de *L. alba*.



No gráfico de scores (Figura 26) pode ser observada a tendência de agrupamento entre as amostras, as quais estão destacadas por cores para os diferentes acessos estudados: 01 (marrom), 02 (vermelho), 24 (verde), 32 (rosa), 39 (azul), 54 (laranja). A primeira Componente Principal (PC1) separa as amostras **01HI, 02HI, 24HI, 32HI, 01II, 02II, 24II, 32II, 39II, 54II, 01IV, 02IV e 24IV** em valores de scores positivos; as amostras **39HI, 54HI, 32IV, 39IV, 54IV, 02HV, 24HV, 32HV, 39HV e 54HV** em valores de scores negativos; e a amostra **01HV** em scores próximo de zero. Por outro lado, a PC2 separa as amostras **02II, 39II, 54II, 02IV, 24IV, 32IV, 39IV e 54IV** em valores positivos de scores; as amostras **01HI, 02HI, 24HI, 32HI, 39HI, 54HI, 01II, 24II, 32II, 01HV, 02HV, 24HV, 32HV, 39HV e 54HV** em valores de scores negativos; e a amostra **01IV** em scores próximo de zero. As denominações **HI, HV, II e IV**, significam, respectivamente, hidroalcoólico da coleta de inverno, hidroalcoólico da coleta de verão, infusão da coleta de inverno e infusão da coleta de verão.

De forma geral, o gráfico de scores nos mostra que: amostras semelhantes estão agrupadas ou em regiões mais próximas entre si no gráfico e amostras diferentes estão em grupos distintos ou em regiões mais distantes entre si. Desta forma, através do gráfico de scores (Figura 26) pode se

observar a separação entre as amostras e a tendência de agrupamento entre elas, dando origem a cinco grupos diferentes nomeados de G1 a G5.

Através da PCA foi possível observar que os acessos 02, 24 e 32 sofrem efeito significativo da sazonalidade quando considerado o método de extração por maceração hidroalcoólica, uma vez que as suas respectivas amostras de inverno (**02HI**, **24HI**, **32HI**) e verão (**02HV**, **24HV**, **32HV**) puderam ser diferenciadas quanto a época de coleta, estando localizadas em grupos distintos no gráfico de *scores* (Figura 26), as de inverno em G2 e as de verão em G1. Por outro lado, os acessos 01, 39 e 54 não sofreram influência significativa da sazonalidade, considerando este método de extração, visto que suas respectivas amostras do inverno e verão não foram diferenciadas quanto a época de coleta; as amostras provenientes do acesso 01 (**01HI** e **01HV**) foram agrupadas em G2 e aquelas dos acessos 39 (**39HI** e **39HV**) e 54 (**54HV** e **54HI**) foram agrupadas em G1.

Considerando o método de preparação por infusão, foi possível observar que a sazonalidade tem efeito significativo na composição química de diversos acessos (24, 32, 39 e 54), uma vez que suas respectivas amostras de verão (**24IV**, **32IV**, **39IV** e **54IV**) e de inverno (**24II**, **32II**, **39II** e **54II**) apresentaram valores de *scores* relativamente diferentes entre si no gráfico da Figura 26, sendo, portanto, diferenciadas através da PCA. As exceções foram os acessos 01 e 02 cujas amostras de verão foram agrupadas com as respectivas amostras de inverno: **01IV** com **01II** em G3 e **02IV** com **02II** em G4.

Quando avaliada as diferenças entre os acessos, considerando especificamente as amostras preparadas por infusão da coleta de verão (amostras **IV**), não foi possível diferenciar os acessos 02 e 24 entre si, pois suas amostras (**02IV** e **24IV**) estão agrupadas em G4, bem como 32, 39 e 54 entre si (amostras agrupadas em G5: **32IV**, **39IV** e **54IV**) (Figura 26). Por outro lado, o acesso 01 não mostrou correlação com nenhum dos anteriores, pois sua amostra (**01IV**) esta localizada em G3.

Por sua vez, quando avaliada as dissimilaridades entre os acessos, considerando as amostras preparadas por infusão referentes a coleta de inverno (amostras **II**), foi possível verificar que os acessos 01, 24 e 32

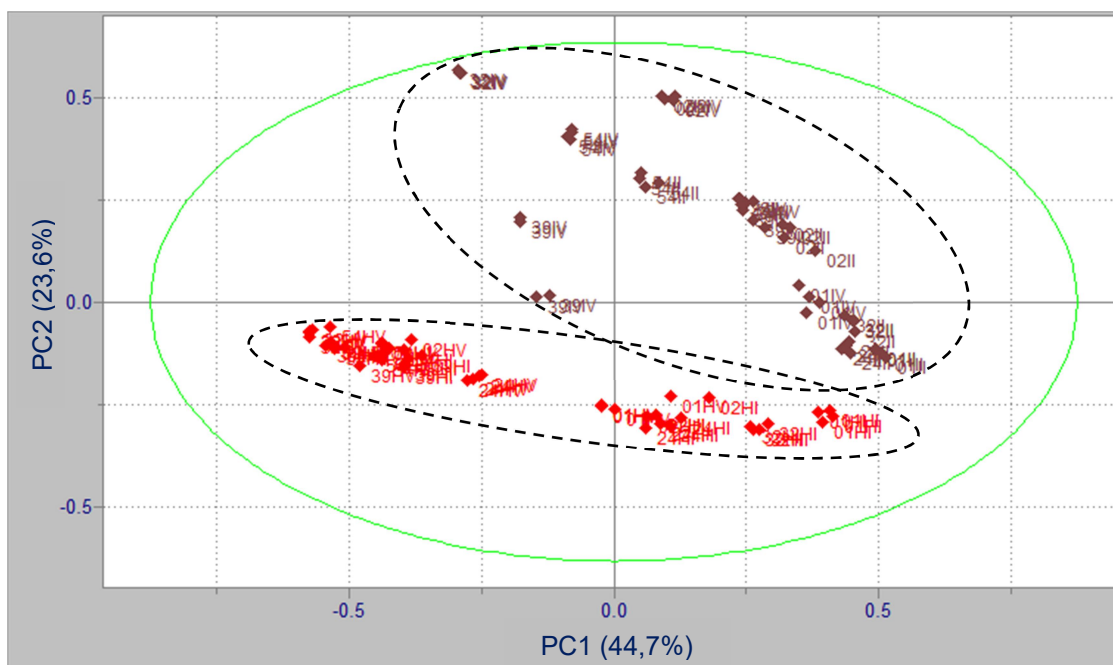
demonstraram grandes similaridades químicas entre si, pois suas amostras (**01II**, **24II** e **32II**) estão agrupadas em G3 (Figura 26). Os acessos 02, 39 e 54 também não puderam ser diferenciados entre si, visto que suas amostras (**02II**, **39II** e **54II**) estão agrupadas em G4, porém apresentaram dissimilaridades com relação ao 01, 24 e 32 (em G3).

Com relação a diferença entre os acessos, considerando a preparação pelo método hidroalcoólico e coleta de verão (amostras **HV**), com exceção do acesso 01, todos os demais apresentaram grandes similaridades químicas entre si, pois suas amostras (**02HV**, **24HV**, **32HV**, **39HV** e **54HV**) estão agrupadas em G1 (Figura 26). Em contrapartida, as amostras hidroalcoólicas da coleta de inverno (**HI**) foram agrupadas em G2, com exceção daquelas obtidas dos acessos 39 e 54. Portanto, não foi possível diferenciar a maioria dos acessos de *L. alba*, tanto da coleta de inverno quanto de verão, quando o método de preparação dos extratos utilizado foi o hidroalcoólico, o que indica grande semelhança na composição química destes acessos, especificamente através deste tipo de preparação.

Com base nos resultados anteriores, foi possível supor que os acessos 39 e 54 são geneticamente semelhantes, pois não foi observada a separação entre suas amostras levando em consideração cada método de preparação e época de coleta em conjunto: as amostras **39II** e **54II** foram agrupadas em G4; **39IV** e **54IV** em G5; **39HI** com **54HI** e **39HV** com **54HV** em G1 (Figura 26). Comportamento similar foi observado nos estudos realizados por Blank *et al.* [4] com 48 acessos de *L. alba*, tendo como objetivo caracterizá-los quimicamente, mostrando que os acessos 39 e 54 também se assemelham, neste caso, quanto a composição química dos seus óleos essenciais.

A Figura 27 mostra o gráfico de *scores* semelhante ao mostrado na Figura 26, porém destacando as amostras preparadas por maceração hidroalcoólicas (**vermelho**) e infusão (**marrom**).

**Figura 27:** Gráfico de *scores* (PC1 versus PC2) das amostras de *L. alba*, destacando o método de preparação: hidroalcoólico (vermelho) e infusão (marrom).



Analisando a Figura 27 foi possível observar que as amostras preparadas pelo método hidroalcoólico, tanto da coleta de inverno quanto da coleta de verão, tentem a se agruparem em valores de *scores* negativos na PC2 (destacadas em vermelho), enquanto que as amostras preparadas por infusão tendem a formar outro grupo, que se estende de valores de *scores* levemente negativos a valores de *scores* positivos nessa PC (destacadas em marrom). Desta forma, foi possível observar que a composição química dos extratos de cada acesso, mostrou diferenças significativas quando comparados os métodos de extração, nesse caso a maceração hidroalcoólica e a infusão.

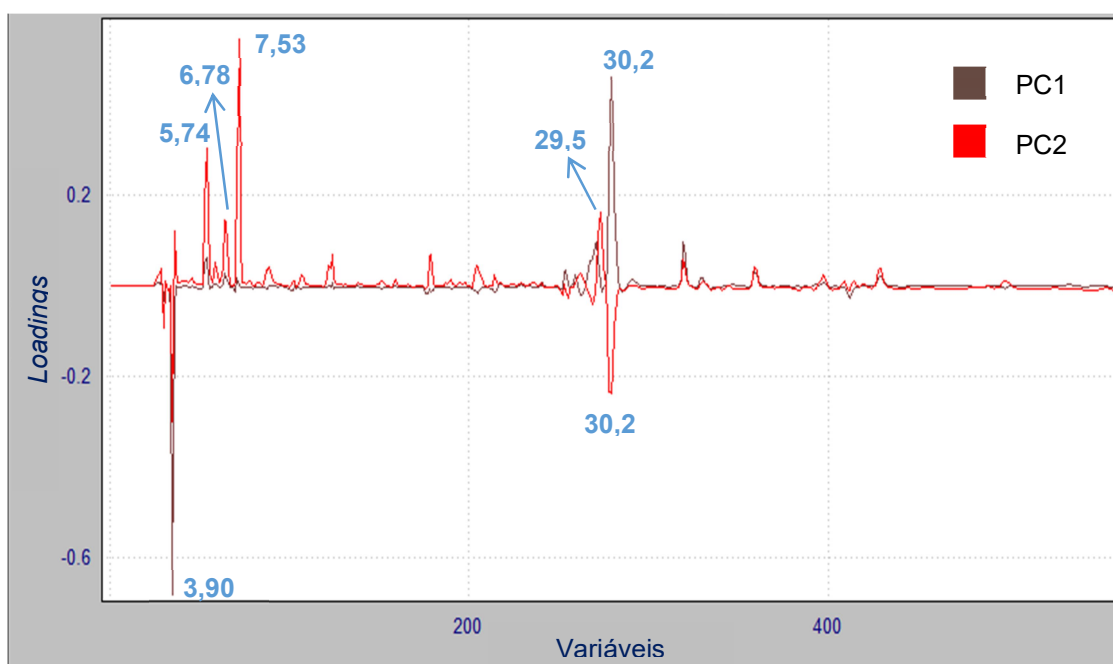
No entanto, é importante ressaltar que as diferenças observadas foram de magnitudes diferentes para cada acesso. Um exemplo disso pode ser observado considerando as amostras **01HI** e **01II**, as quais estão, mesmo que em grupos distintos, em regiões mais próximas no gráfico de *scores* com valores de *scores* positivos na PC1 (Figura 27). Entretanto, as amostras **54HV** e **54IV** estão em regiões mais afastadas no gráfico de *scores*, apresentando valores de *scores* negativos na PC1, mas inversos em PC2: a **54HV** em PC2

negativo e **54IV** em PC2 positivo, mostrando que o acesso 54, quando coletado no verão, foi melhor diferenciado quanto ao método de preparação do que o acesso 01, quando coletado no inverno.

Desta forma, através da PCA foi possível observar e constatar a influência do método de preparação na composição química de extratos obtidos de *L. alba*, visto que se pôde observar a tendência no agrupamento das amostras preparadas de formas diferentes, dando origem a dois grupos distintos, como apresentado no gráfico de *scores* na Figura 27.

Na avaliação das dissimilaridades e/ou agrupamentos entre amostras pela PCA deve-se ter em mente que algumas variáveis exercem maior influência do que outras. A maneira de se avaliar quais variáveis são mais importantes para a discriminação e/ou agrupamento entre as amostras estudadas é através do gráfico de *loadings*, o qual representa a importância (ou peso) que cada variável teve na construção de cada componente principal e na projeção das amostras pelos *scores*. Assim, as diferenças entre as amostras estudadas podem ser explicadas analisando-se o gráfico de *loadings* (Figura 28) em conjunto com o gráfico de *scores* [15, 138].

**Figura 28:** Gráfico de *loadings* das amostras de *L. alba*: PC1 (marrom) e PC2 (vermelho).



No gráfico de *loadings* (Figura 28) é possível observar que algumas bandas cromatográficas se destacam com valores de *loadings* positivos e negativos, tanto na PC1 quanto na PC2. Essas bandas cromatográficas (variáveis inerentes às amostras) são justamente aquelas que possuem maior importância e, portanto, contribuem mais para a diferenciação e/ou agrupamento observado entre as amostras no gráfico de *scores* (Figura 26) [60, 154, 155].

Desta forma, os *loadings* da PC1 apresentam as bandas cromatográficas com maior influência (peso) na projeção das amostras nessa PC, contendo variáveis com valores positivos e negativos. Assim sendo, as amostras **02HI, 24HI, 01II, 02II, 24II, 32II, 39II, 54II, 01HI, 32HI, 01IV, 02IV e 24IV**, que possuem valores de *scores* positivos na PC1 (Figura 26) estão principalmente correlacionadas com a banda cromatográfica com tempo de retenção de 30,2 minutos (Figura 28), com valor positivo no *loadings* da PC1, sendo, portanto, característica destas amostras e a mais importante na discriminação delas das demais. Em contrapartida, as amostras **39HI, 54HI, 32IV, 39IV, 54IV, 02HV, 24HV, 32HV, 39HV e 54HV**, em valores de *scores* negativos na PC1, têm como banda cromatográfica característica aquela com tempo de retenção de 3,90 minutos, que apresenta valor negativo no *loadings* da PC1, sendo, portanto, a responsável pela projeção destas amostras nesta PC.

Os *loadings* da PC2 apresentam variáveis com valores positivos e negativos. As bandas cromatográficas com tempo de retenção 5,74; 6,78; 7,53 e 29,5 minutos (Figura 28), que apresentam valores positivos no *loadings* da PC2, são responsáveis pela correlação entre as amostras **02II, 39II, 54II, 02IV, 24IV, 32IV, 39IV e 54IV**, com valores positivos nessa PC no gráfico de *scores* (Figura 26). As amostras com valores negativos de *scores* em PC2: **01HI, 02HI, 24HI, 32HI, 39HI, 54HI, 01II, 24II, 32II, 01HV, 02HV, 24HV, 32HV, 39HV e 54HV** estão correlacionadas com as bandas cromatográficas que apresentam valores negativos em PC2 no gráfico de *loadings*, as quais correspondem aos tempos de retenção de 3,90 e 30,2 minutos.

As amostras **01HV** e **01IV** possuem variáveis características que não contribuem significativamente (possui baixo peso) para a composição da PC1 e PC2, respectivamente, e, portanto, apresentam valores de *scores* nas respectivas PCs muito próximos de zero (Figura 26), não sendo possível observar bandas cromatográficas que se destaquem no gráfico de *loadings* [60, 154].

Analisando o gráfico de *scores* na Figura 26, pode-se observar que, com exceção da **01HV**, as amostras hidroalcoólicas da coleta verão dos demais acessos (**02HV**, **24HV**, **32HV**, **39HV**, **54HV**) estão fortemente agrupadas em valores negativos de *scores* tanto na PC1 quanto na PC2, estando altamente correlacionadas com o metabólito que elui em 3,90 minutos, que é o mais característico destas amostras e também das amostras **39HI** e **54HI**.

Avaliando-se de forma conjunta os gráficos de *scores* (Figura 27) e *loadings* (Figura 28) pode-se supor que a maioria das amostras de infusão (coleta de verão e inverno), com exceção da **01IV**, **01II**, **24II** e **32II**, apresentam como metabólitos mais característicos aqueles que eluem nos tempos de retenção de 5,74; 6,78; 7,53 e 29,5 minutos, pois estão agrupadas em valores de *scores* positivos em PC2. Desta forma, tais metabólitos são possivelmente obtidos em quantidades relativamente maiores nas infusões desta espécie em relação às suas macerações hidroalcoólicas.

Além disso, podemos observar que o metabólito que elui em 30,2 minutos, apresentando valor positivo no *loading* da PC1 e negativo na PC2 (Figura 28), é o principal responsável pela projeção das amostras **01HI**, **02HI**, **24HI**, **32HI**, **01II**, **24II** e **32II** no gráfico de *scores* (Figura 26) e, portanto, mais característico destas amostras.

A partir dos resultados obtidos através dos *fingerprints* cromatográficos e da PCA foi possível observar que a sazonalidade, o método de extração e a individualidade de cada espécime são fatores que devem ser levados em consideração quanto à utilização de plantas medicinais para fins terapêuticos, nesse caso, especificamente, para *L. alba* (erva-cidreira).

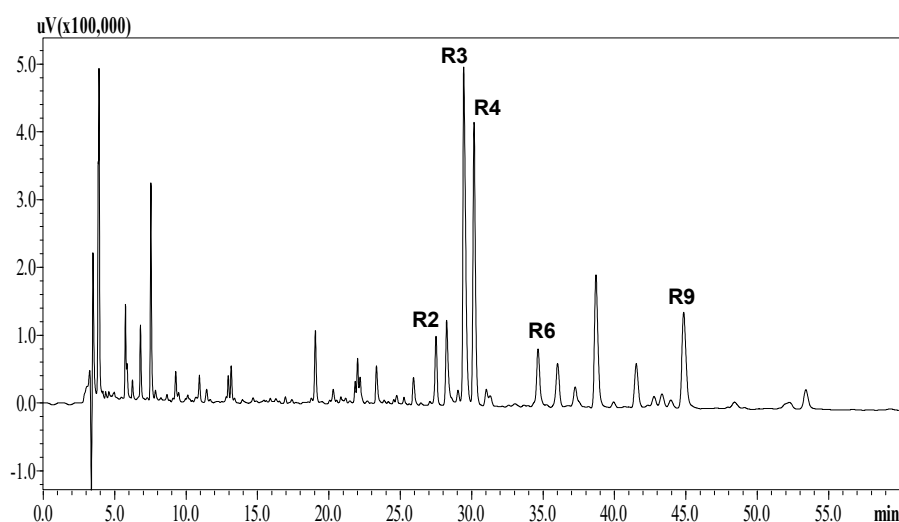


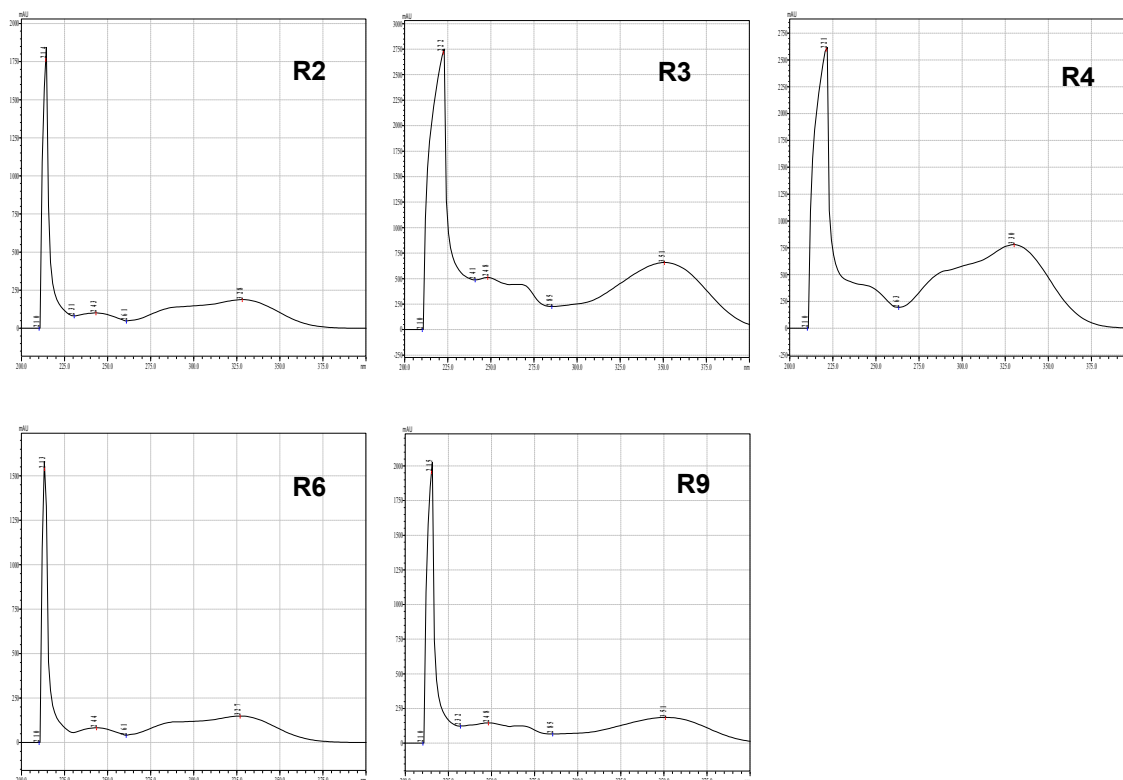
#### 4.4 Análise por RMN das substâncias químicas isoladas por CL-DAD-SPE

As análises por CL-DAD-SPE utilizando o **sistema Agilent** (seção 3.2, seguindo o procedimento descrito na seção 3.7) permitiram o trapeamento (isolamento) de nove substâncias, denominadas de **R1** a **R9**, presentes no extrato **54II**, das quais apenas a **R4** e **R9** foram obtidas em concentração e grau de pureza suficiente para gerar espectros de RMN que permitissem a sua interpretação e identificação. No entanto, foi possível propor as classes de mais três substâncias: **R2** e **R6** como derivados fenilpropanóides [156] e **R3** como um flavonóide diglicosilado [157].

A Figura 29 mostra um cromatograma (a 240 nm) representativo do extrato **54II**, destacando as substâncias **R2**, **R3**, **R4**, **R6** e **R9**, juntamente com os seus respectivos espectros de absorção no UV obtidos através do detector DAD do **sistema analítico** (seção 3.2).

**Figura 29:** Cromatograma representativo (a 240 nm) do extrato **54II** e espectros de absorção no UV (200 a 400 nm) das substâncias **R2**, **R3**, **R4**, **R6** e **R9** obtidos através do detector DAD do **sistema analítico**.

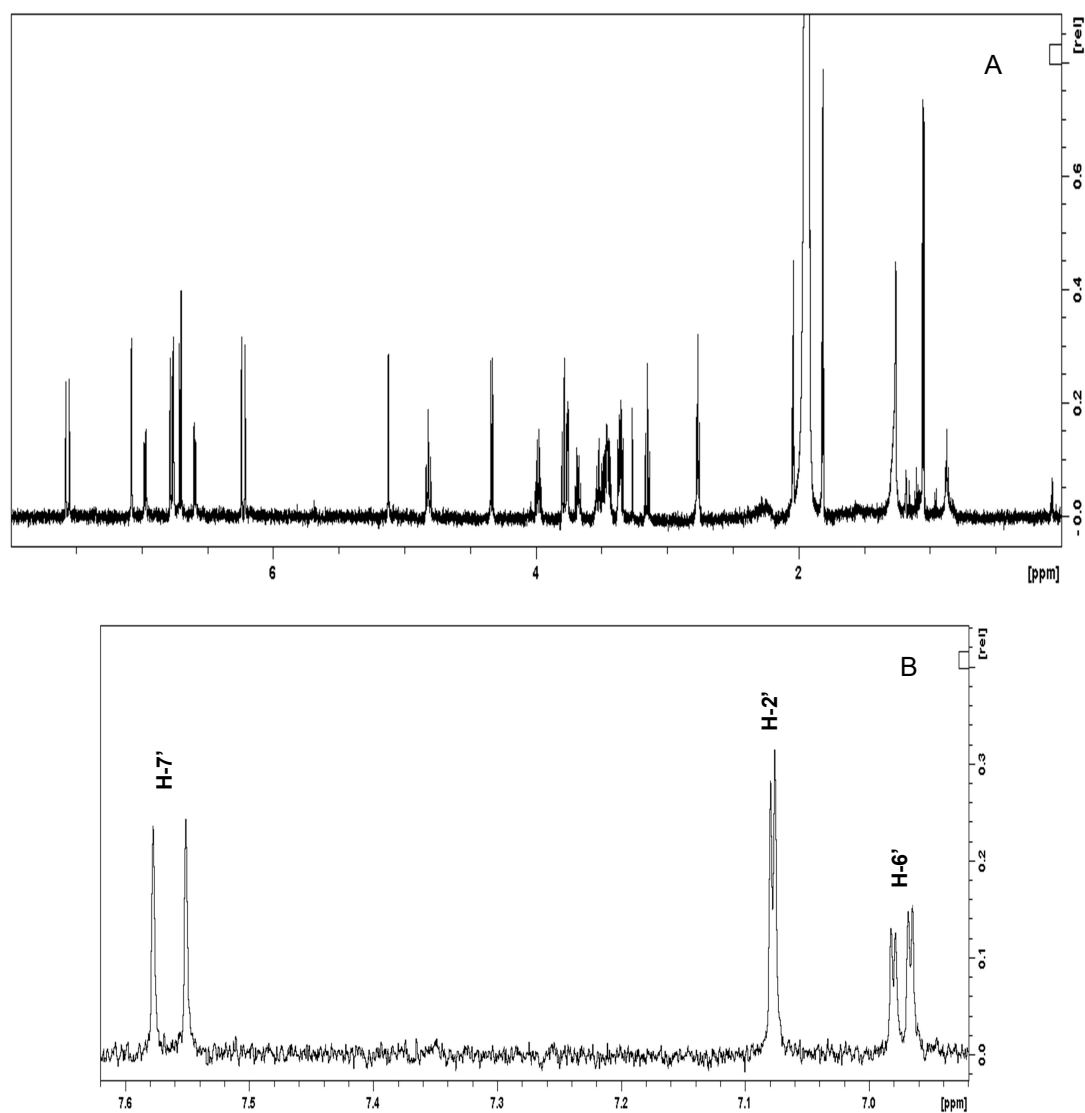


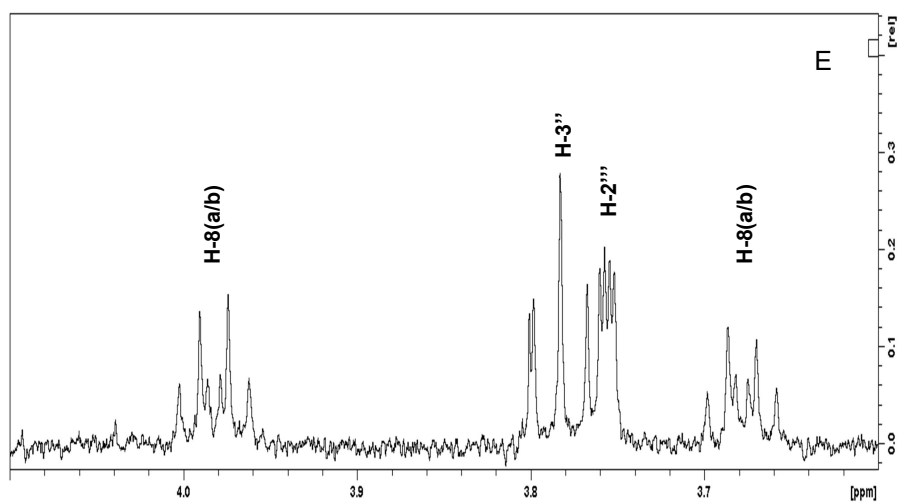
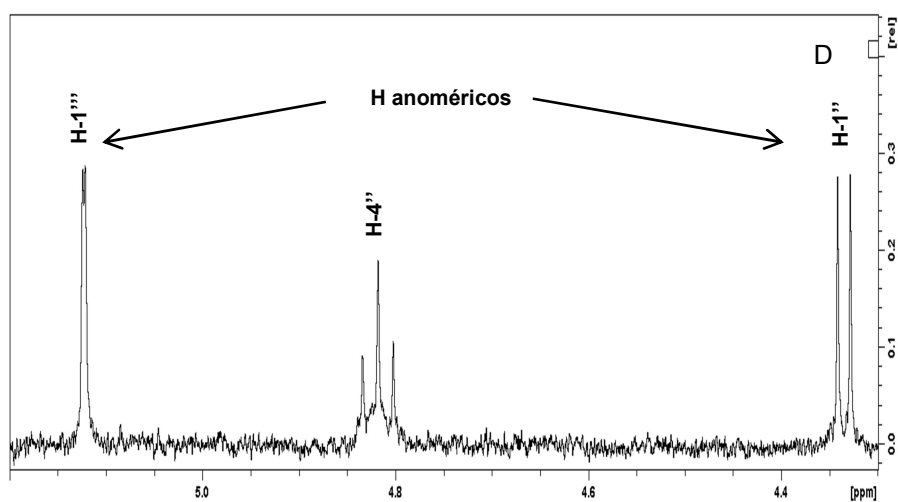
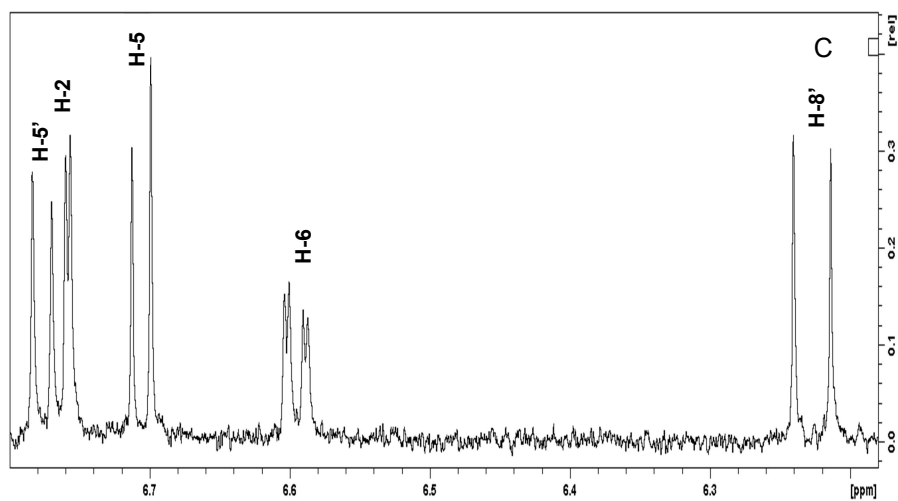


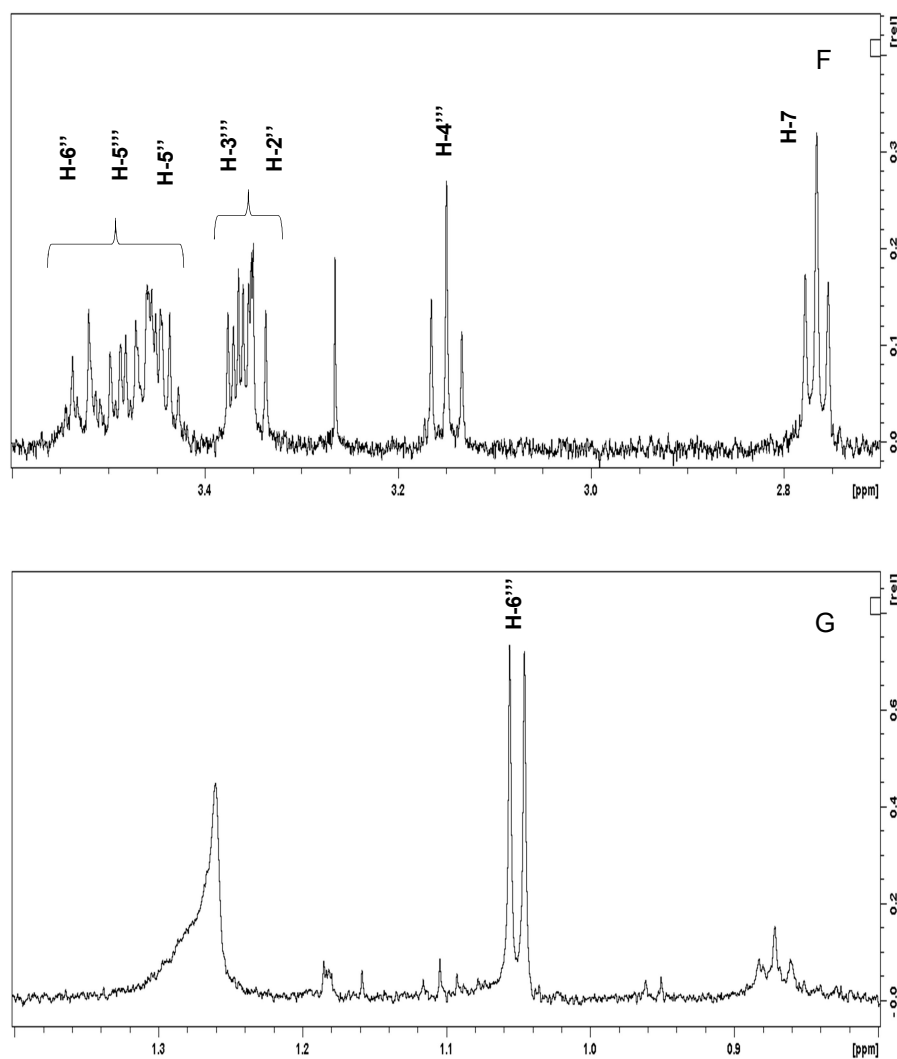
#### 4.4.1 Identificação da substância R4

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  para a substância **R4**, obtido em acetonitrila deuterada ( $\text{ACN-}d_3$ ), apresentou sinais compatíveis com um derivado de fenilpropanóide/feniletanóide (Figura 30), classe de compostos comum no gênero *Lippia*. Esse espectro foi calibrado através do sinal residual da  $\text{ACN-}d_3$ , em  $\delta_{\text{H}}$  1,93, utilizada para a dissolução desta amostra.

**Figura 30:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{ACN-}d_3$ ) da substância **R4** (A, de  $\delta_{\text{H}}$  8,0 a 0,0) e suas expansões: (B) entre  $\delta_{\text{H}}$  7,62 e 6,92; (C) entre  $\delta_{\text{H}}$  6,80 e 6,18; (D) entre  $\delta_{\text{H}}$  5,20 e 4,30; (E) entre  $\delta_{\text{H}}$  4,10 e 3,60; (F) entre  $\delta_{\text{H}}$  3,60 e 2,70 e (G) de  $\delta_{\text{H}}$  1,40 a 0,80.



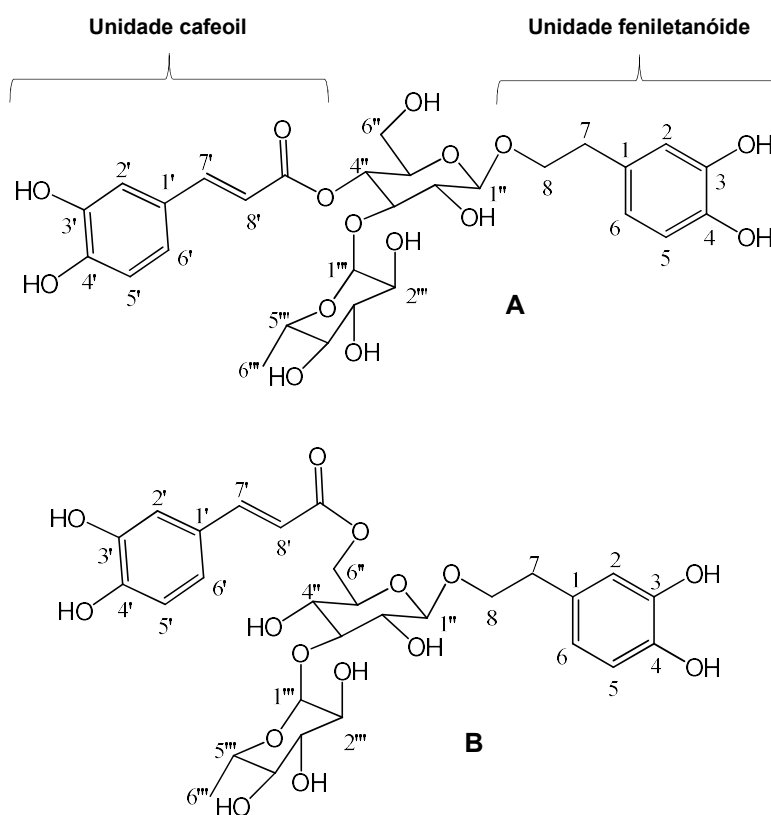




O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **R4** (Figura 30) apresentou dois conjuntos de sinais, que caracterizam a presença de dois sistemas aromáticos 1,3,4-trissubstituídos: o primeiro em  $\delta_{\text{H}}$  6,76 (*d*, 1H,  $J = 2,02$  Hz, H-2),  $\delta_{\text{H}}$  6,70 (*d*, 1H,  $J = 8,03$  Hz, H-5) e  $\delta_{\text{H}}$  6,59 (*dd*, 1H,  $J = 8,03$  e  $2,02$  Hz, H-6) e o segundo em  $\delta_{\text{H}}$  7,08 (*d*, 1H,  $J = 2,03$  Hz, H-2'),  $\delta_{\text{H}}$  6,97 (*dd*, 1H,  $J = 8,20$  e  $2,03$  Hz, H-6') e  $\delta_{\text{H}}$  6,78 (*d*, 1H,  $J = 8,20$  Hz, H-5'). Além disso, foi observada a presença de dois dubletos: um em  $\delta_{\text{H}}$  7,56 (1H, H-7') e outro em  $\delta_{\text{H}}$  6,23 (1H, H-8') com constante de acoplamento igual a  $15,88$  Hz, que indica a presença de uma ligação dupla com configuração *trans*. Os deslocamentos químicos desses dubletos indicam um sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado conjugado a um anel aromático, e, juntamente com o conjunto de sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,08 (H-2'),  $\delta_{\text{H}}$  6,97 (H-6') e  $\delta_{\text{H}}$  6,78 (H-5'), sugerem a presença de uma unidade cafeoil. A

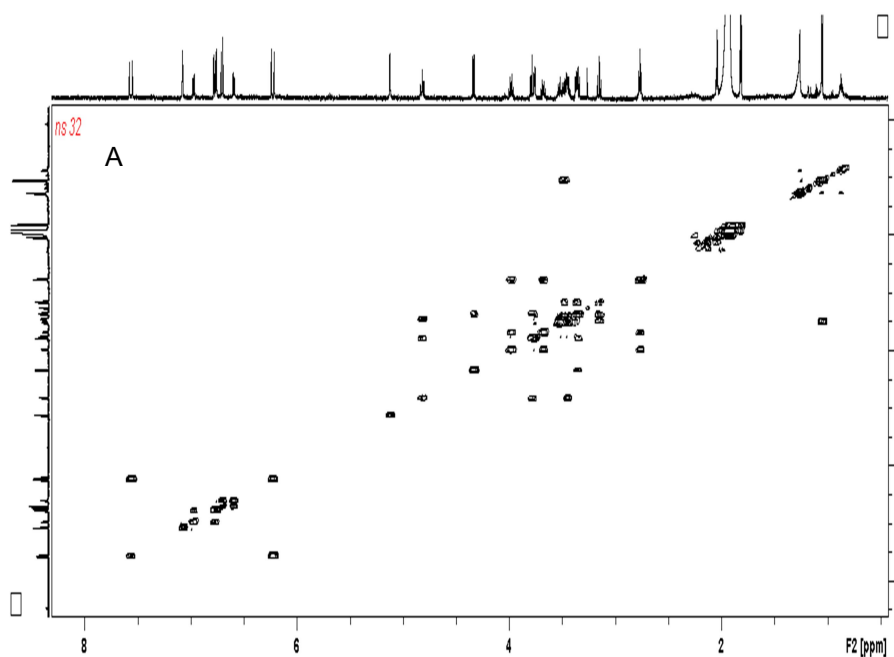
presença de dois dubletos, em  $\delta_H$  5,12 (1H,  $J = 1,36$  Hz, H-1''') e  $\delta_H$  4,33 (1H,  $J = 7,92$  Hz, H-1''), indicam a presença de hidrogênios anoméricos, caracterizando a existência de duas unidades de açúcar nesta molécula, sendo que uma delas provavelmente é a ramnose, caracterizada pela presença do dubleto em  $\delta_H$  1,05 (3H,  $J = 6,25$  Hz) referente aos hidrogênios da metila em C-6''' (ver estruturas na Figura 31). Nesse espectro, foi observado, ainda, um tripleto largo, integrando para 2H, em  $\delta_H$  2,77 ( $J = 7,08$  Hz, H-7), característico de hidrogênios metilênicos ( $CH_2$ ) equivalentes, e dois duplos tripletos em  $\delta_H$  3,98 ( $J = 9,85$  e  $7,08$  Hz) e em  $\delta_H$  3,68 ( $J = 9,85$  e  $7,08$  Hz), ambos integrando para 1H, que sugeriram a presença de dois hidrogênios não equivalentes ligados a um carbono oxigenado da posição 8 (C-8). A observação destes sinais, juntamente com aqueles em  $\delta_H$  6,76 (H-2),  $\delta_H$  6,70 (H-5) e  $\delta_H$  6,59 (H-6), indicaram a presença de uma unidade feniletanóide na estrutura desta substância [113, 129, 158].

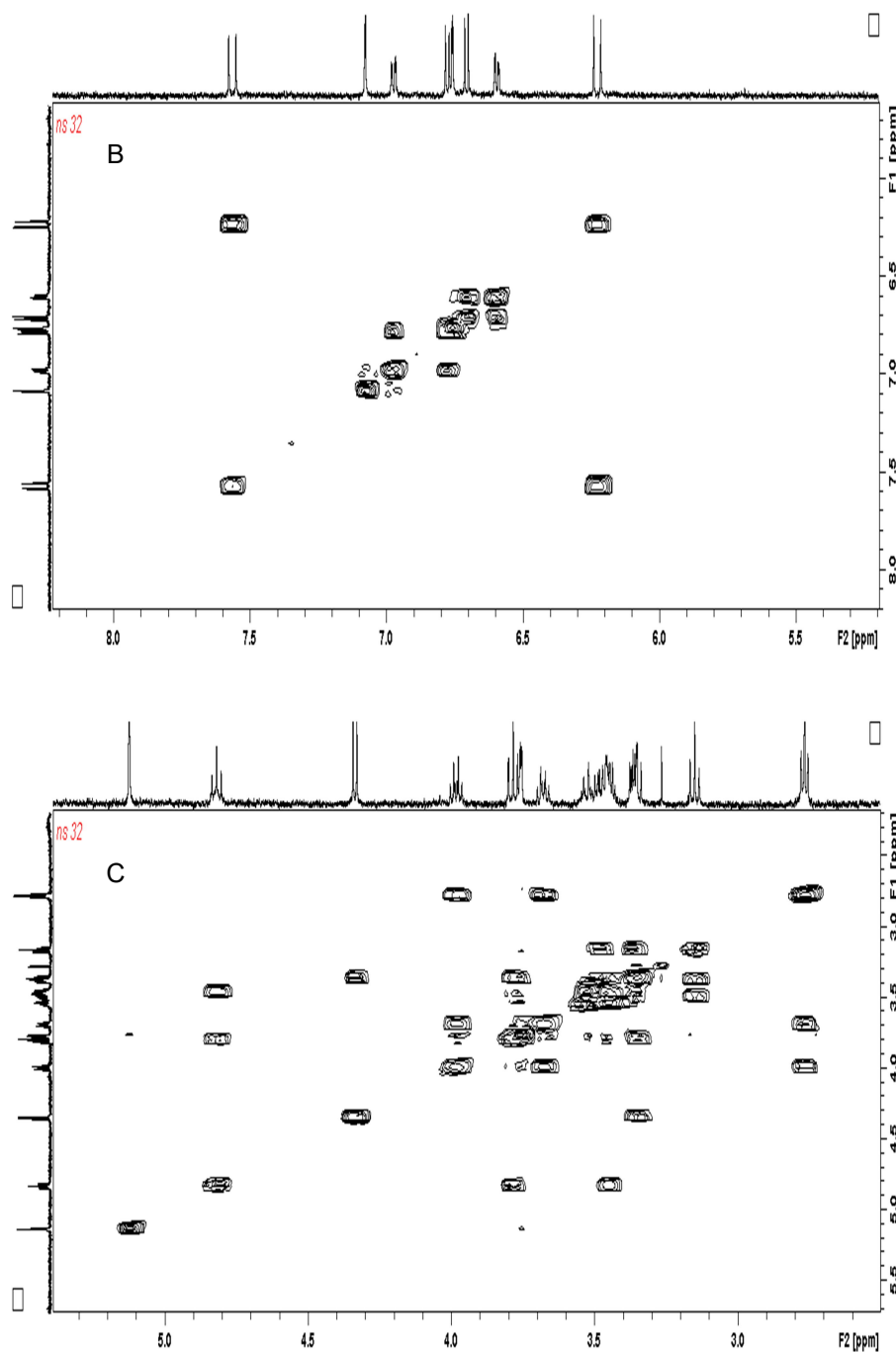
**Figura 31:** Estruturas dos isômeros Verbascosídeo (A) e Isoverbascosídeo (B).



Através do mapa de contornos gCOSY de **R4** (Figura 32), em que é possível verificar a existência de correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  a curta distância ( $^2J$ ,  $^3J$ , e  $^4J$ ), pôde-se observar as correlações entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  6,70 (H-5) e  $\delta_{\text{H}}$  6,59 (H-6), assim como as correlações entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7,08 (H-2') e  $\delta_{\text{H}}$  6,78 (H-5') com aquele em  $\delta_{\text{H}}$  6,97 (H-6'). Além disso, foi possível confirmar o acoplamento entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7,56 (H-7') e  $\delta_{\text{H}}$  6,23 (H-8'), característicos de dupla ligação *trans*, e, ainda, as correlações entre os hidrogênios anoméricos, em  $\delta_{\text{H}}$  5,12 (H-1''') e  $\delta_{\text{H}}$  4,33 (H-1''), com os respectivos sinais de hidrogênios, em  $\delta_{\text{H}}$  3,77 (*dd-m*, H-2''') e  $\delta_{\text{H}}$  3,38-3,33 (*m*, H-2''), ligados aos carbonos adjacentes.

**Figura 32:** Mapa de contornos de gCOSY (600 MHz, ACN- $d_3$ ) da substância **R4** (A) e expansões (B e C).





O mapa de contornos *g*COSY (Figura 32) de **R4** também possibilitou a observação das seguintes correlações: 1) entre o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,78 (H-3'') com aqueles em  $\delta_{\text{H}}$  3,38-3,33 (*m*, H-2'') e em  $\delta_{\text{H}}$  4,82 (H-4'') e deste último como o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,55-3,42 (*m*, H-5''); 2) entre o sinal do multipeto, referente ao hidrogênio H-3''', em  $\delta_{\text{H}}$  3,38-3,33, com aqueles em  $\delta_{\text{H}}$  3,77 (H-2''') e em  $\delta_{\text{H}}$



3,15 (H-4'''); 3) entre o sinal do multipeto, referente ao hidrogênio H-5''', em  $\delta_H$  3,55-3,42, com aqueles em  $\delta_H$  3,15 (H-4''') e em  $\delta_H$  1,05 (H-6''').

A partir dos resultados de RMN  $^1H$  e  $gCOSY$  obtidos e comparação com aqueles descritos na literatura [113, 129, 156, 158, 159], foi possível sugerir que a substância **R4** se trata do verbascosídeo ou do seu isômero constitucional, o isoverbascosídeo (Figura 31), substâncias já encontradas em extratos aquosos [115] e hidroalcoólicos [117] de *L. alba*.

Contudo, não foi possível identificar de forma inequívoca a estrutura desta substância devido a carência de algumas informações, que poderiam ser obtidas através dos experimentos de RMN  $^{13}C$ ,  $gHSQC$  e  $gHMBC$ . Devido a pouca disponibilidade do equipamento de RMN, no momento da aquisição dos dados, estes experimentos não puderam ser realizados.

De modo geral, através de experimentos HSQC (ou  $gHSQC$ ) podem ser observadas correlações existentes entre um átomo de hidrogênio e o átomo de carbono ao qual está ligado e, de forma indireta, determinar os deslocamentos químicos de carbono-13 ( $^{13}C$ ) de vários carbonos presentes na substância. Por outro lado, o experimento HMBC (ou  $gHMBC$ ) permite observar correlações entre hidrogênio e carbono a longa distância ( $^3J$ ,  $^4J$  e até  $^5J$ ), possibilitando, ainda, observar os deslocamentos químicos de  $^{13}C$  não hidrogenados. Desta forma, a partir do espectro  $gHMBC$  seria possível, por exemplo, verificar qual a posição exata em que a unidade cafeoil está ligada: no oxigênio ligado ao carbono C-4'' (verbascosídeo) ou no oxigênio ligado ao carbono C-6'' (isoverbascosídeo), como mostrado nas estruturas da Figura 31. [113, 158].

Portanto, diante do problema encontrado com relação a definição da estrutura do composto isolado as análises adicionais de RMN,  $gHSQC$  e  $gHMBC$  serão requisitados.

Os dados de RMN  $^1H$  e  $gCOSY$ , deslocamentos químicos e correlações  $^1H$ - $^1H$ , para a substância **R4** estão mostrados na Tabela 5.

**Tabela 5:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $g\text{COSY}$  da substância **R4** (600 MHz,  $\text{ACN-}d_3$ ).

Posição	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> ; int.)	$g\text{COSY}$
<b>Unidade feniletanóide</b>		
<b>1</b>	-	-
<b>2</b>	6,76 (d; 2,02; 1H)	H-6
<b>3</b>	-	-
<b>4</b>	-	-
<b>5</b>	6,70 (d; 8,03; 1H)	H-6
<b>6</b>	6,59 (dd; 8,03; 2,02; 1H)	H-5 e H2
<b>8(a/b)</b>	3,98 (dt; 9,85; 7,08; 1H) 3,68 (dt; 9,85; 7,08; 1H)	H-8(a/b) e H-7
<b>7</b>	2,77 (tl; 7,08)	H-8(a/b)
<b>Unidade cafeoil</b>		
<b>1'</b>	-	-
<b>2'</b>	7,08 (d; 2,03; 1H)	H-6'
<b>3'</b>	-	-
<b>4'</b>	-	-
<b>5'</b>	6,78 (d; 8,20; 1H)	H-6'
<b>6'</b>	6,97 (dd; 8,20; 2,03; 1H)	H-5' e H2'
<b>7'</b>	7,56 (d; 15,88; 1H)	H-8'
<b>8'</b>	6,23 (d; 15,88; 1H)	H-7'
<b>9'</b>	-	-
<b>Glicose</b>		
<b>1''</b>	4,33 (d; 7,92; 1H)	H-2''
<b>2''</b>	3,38-3,33 (m)	H-3'' e H-1''
<b>3''</b>	3,78 (t; 9,43)	H-4'' e H-2''
<b>4''</b>	4,82 (t; 9,43)	H-5'' e H-3''
<b>5''</b>	3,55-3,42 (m)	H-4''
<b>6''</b>	3,55-3,42 (m)	NC
<b>Ramnose</b>		
<b>1'''</b>	5,12 (d; 1,36; 1H)	H-2'''
<b>2'''</b>	3,77 (dd-m)	H-3''' e H-1'''
<b>3'''</b>	3,38-3,33 (m)	H-4''' e H-2'''
<b>4'''</b>	3,15 (t; 9,47)	H-5''' e H-3'''
<b>5'''</b>	3,55-3,42 (m)	H-6''' e H-4'''
<b>6'''</b>	1,05 (d; 6,25)	H-5'''

$\delta$ : Deslocamento químico (ppm); *m*: Multiplicidade; *J* (Hz): Correlações; int.: Integração; **NC**: Não claro.

A Tabela 6 mostra a comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  obtidos para a substância **R4** com aqueles descritos na literatura para o verbascosídeo e isoverbascosídeo.

**Tabela 6:** Comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  da substância **R4** (600 MHz,  $\text{ACN-}d_3$ ) com aqueles descritos na literatura para o verbascosídeo e isoverbacosídeo.

	<b>R4</b>	<b><sup>a</sup>Verbascosídeo</b>	<b><sup>b</sup>Isoverbacosídeo</b>
<b>Posição</b>	<b><math>\delta_{\text{H}}</math> (<i>m</i>; <i>J</i>)</b>	<b><math>\delta_{\text{H}}</math> (<i>m</i>; <i>J</i>)</b>	<b><math>\delta_{\text{H}}</math> (<i>m</i>; <i>J</i>)</b>
<b>Unidade feniletanóide</b>			
<b>1</b>	-	-	-
<b>2</b>	6,76 (d; 2,02)	6,70 (d; 1,95)	6,64 (m)
<b>3</b>	-	-	-
<b>4</b>	-	-	-
<b>5</b>	6,70 (d; 8,03)	6,68 (d; 8,00)	6,64 (m)
<b>6</b>	6,59 (dd; 8,03; 2,02)	6,57 (dd; 8,05; 2,00)	6,53 (dd; 8,10; 2,00)
<b>8</b>	3,98 (dt; 9,85; 7,08) 3,68 (dt; 9,85; 7,08)	4,05 (m); 3,72 (m)	4,05 (m); 3,67 (m)
<b>7</b>	2,77 (tl; 7,08)	2,80 (m)	2,75 (t; 7,00)
<b>Unidade cafeoil</b>			
<b>1'</b>	-	-	-
<b>2'</b>	7,08 (d; 2,03)	7,06 (d; 1,95)	7,01 (d; 1,90)
<b>3'</b>	-	-	-
<b>4'</b>	-	-	-
<b>5'</b>	6,78 (d; 8,20)	6,96 (dd; 8,20; 2,00)	6,72 (d; 8,20)
<b>6'</b>	6,97 (dd; 8,20; 2,03)	6,96 (dd; 8,20; 2,00)	6,92 (dd; 8,30; 2,00)
<b>7'</b>	7,56 (d; 15,88)	7,60 (d; 15,90)	7,52 (d; 15,90)
<b>8'</b>	6,23 (d; 15,88)	6,28 (d; 15,90)	6,20 (d; 15,90)
<b>9'</b>	-	-	-
<b>Glicose</b>			
<b>1''</b>	4,33 (d; 7,92)	4,38 (d; 7,90)	4,32 (d; 7,90)
<b>2''</b>	3,38-3,33 (m)	3,39 (dd; 9,00; 8,10)	3,57 (NC)
<b>3''</b>	3,78 (t; 9,43)	3,82 (t; 9,20)	3,54 (NC)
<b>4''</b>	4,82 (t; 9,43)	4,92 (t; 9,50)	4,87 (m)
<b>5''</b>	3,55-3,42 (m)	3,56 (m)	3,65 (m)
<b>6''</b>	3,55-3,42 (m, NC)	3,61 (d; 12,30) 3,57 (dd; 12,60; 6,30)	3,90 (m); 3,65 (m)
<b>Ramnose</b>			
<b>1'''</b>	5,12 (d; 1,36)	5,18 d (1,5)	5,14 (d; 1,50)
<b>2'''</b>	3,77 (dd-m)	3,92 (dd; 4,90; 1,30)	3,77 (m)
<b>3'''</b>	3,38-3,33 (m)	3,58 (dd; 9,60; 3,30)	3,39 (NC)
<b>4'''</b>	3,15 (t; 9,47)	3,30 (NC)	3,26 (NC)
<b>5'''</b>	3,55-3,42 (m)	3,56 (m)	3,63 (NC)
<b>6'''</b>	1,05 (d; 6,25)	1,09 (d; 6,20)	1,04 (d; 6,20)

$\delta$ : Deslocamento químico (ppm); *m*: Multiplicidade; *J* (Hz): Correlações; **NC**: Não claro;

<sup>a</sup>Cheng *et al.* [129] (Equipamento e solvente de análise não especificados pelo autor);

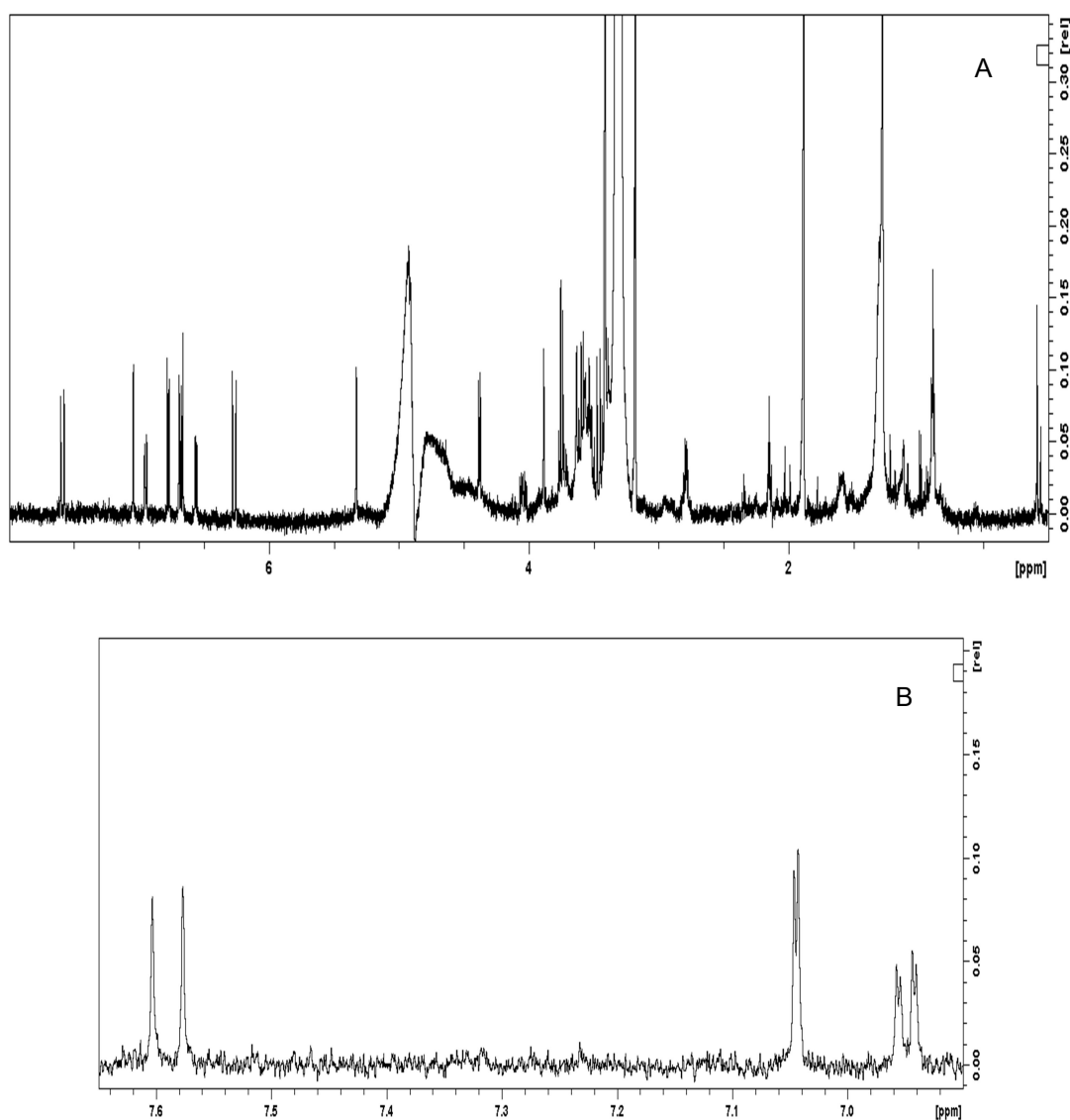
<sup>b</sup>Olivier *et al.* [113] (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ).

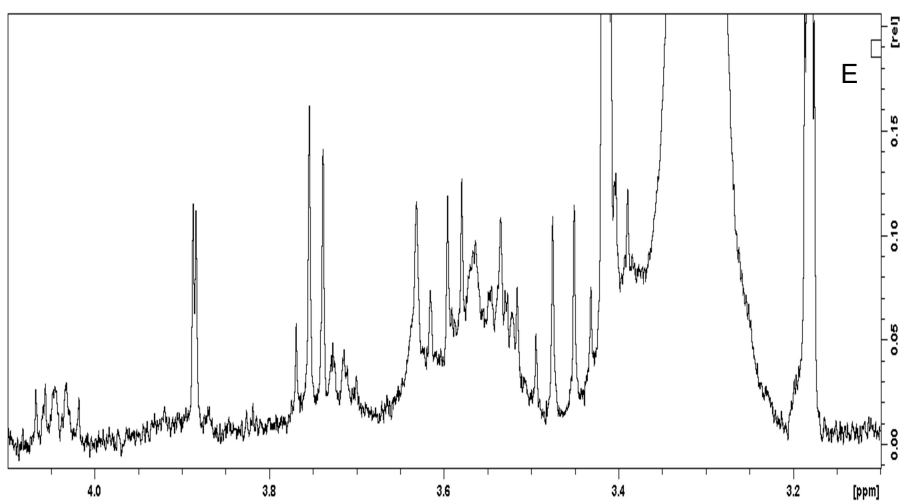
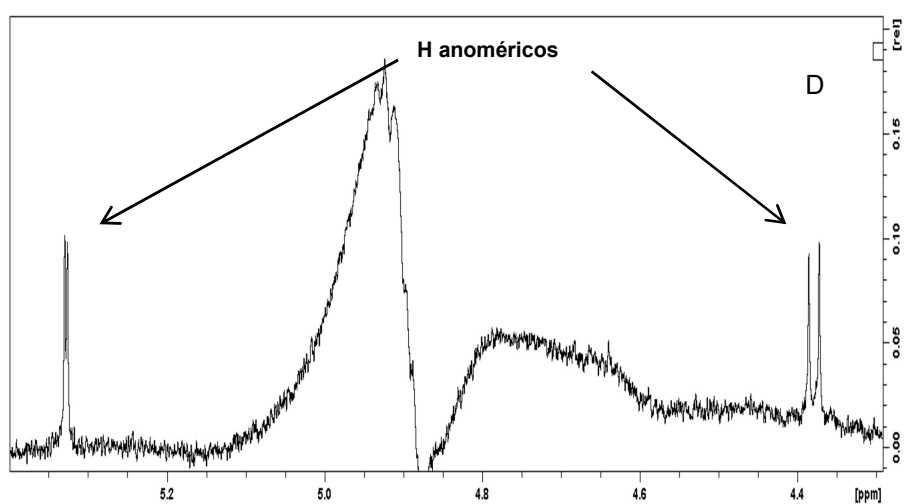
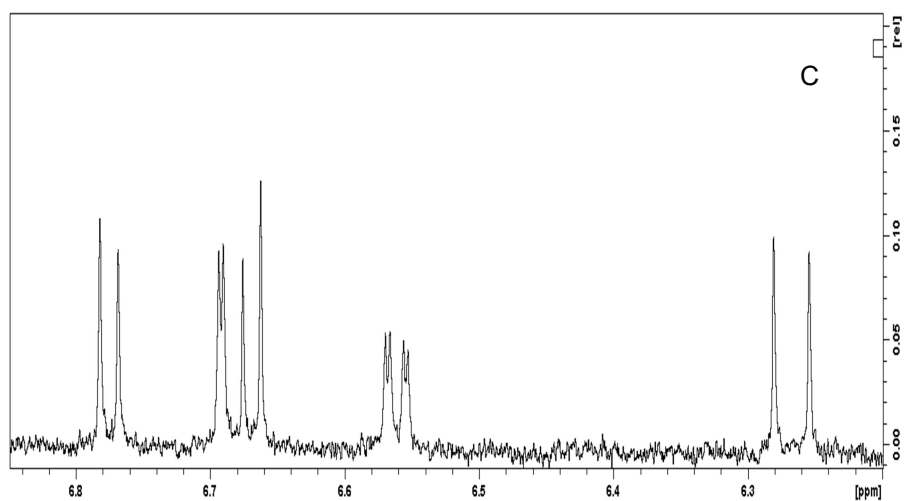
Analisando-se a Tabela 6 pode-se verificar a grande similaridade entre os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento observados para a substância **R4** e os resultados encontrados na literatura, tanto para o verbascosídeo quanto para o isoverbacosídeo, reforçando a suposição de que o **R4** pode ser um destes dois isômeros.

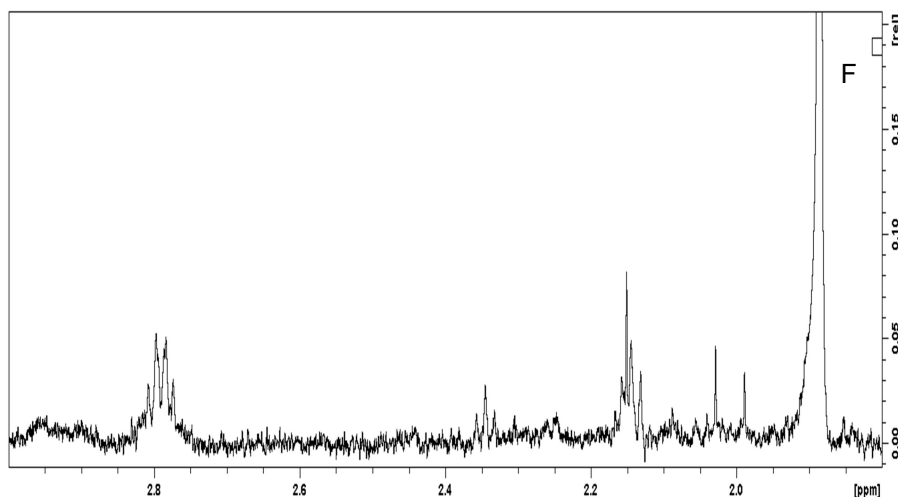
#### 4.4.2 Identificação das substâncias R2 e R6

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  das substâncias **R2** e **R6** se mostraram bastantes similares ao observado para a substância **R4** (Figura 30). Neste caso, porém, os espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram obtidos em metanol deuterado ( $\text{MeOH-}d_4$ ) e calibrados através do sinal residual deste solvente em  $\delta_{\text{H}}$  3,30. Na Figura 33 está mostrado o espectro RMN  $^1\text{H}$  da substância **R2**.

**Figura 33:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) da substância **R2** (A, de  $\delta_{\text{H}}$  8,0 a 0,0) e suas expansões: (B) entre  $\delta_{\text{H}}$  7,65 e 6,90; (C) entre  $\delta_{\text{H}}$  6,85 e 6,20; (D) entre  $\delta_{\text{H}}$  5,40 e 4,30; (E) entre  $\delta_{\text{H}}$  4,10 e 3,10; (F) entre  $\delta_{\text{H}}$  3,0 e 1,70.







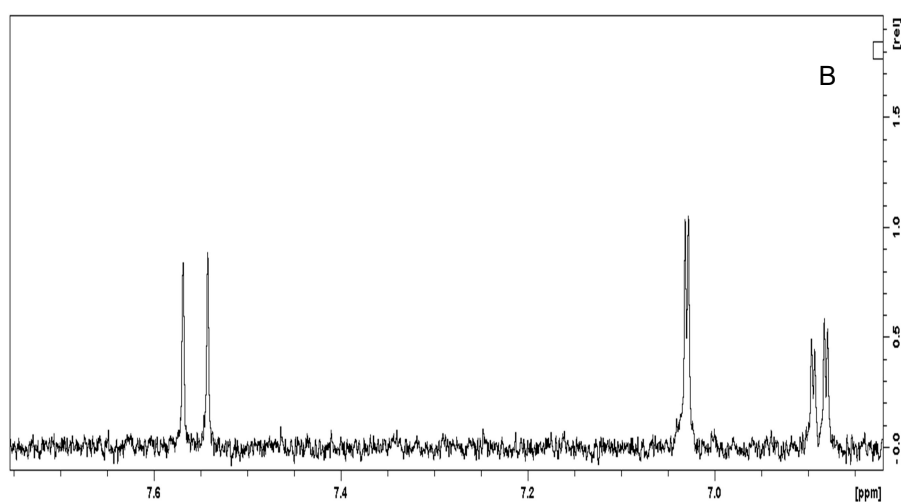
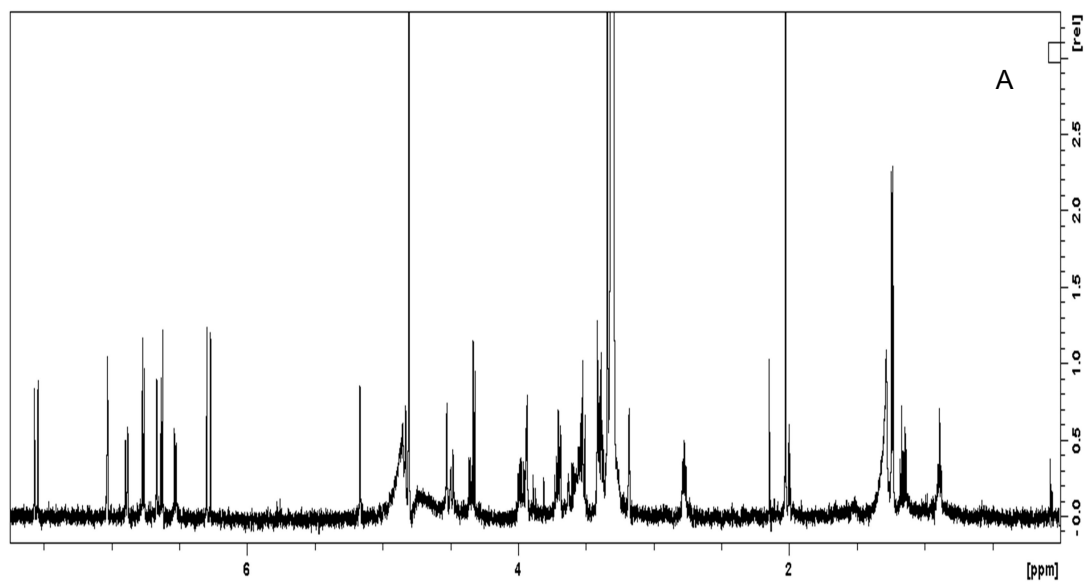
A substância **R2** (Figura 33) apresentou padrão de deslocamento químico e constantes de acoplamento bastante semelhantes ao da **R4**, mostrando os dois conjuntos de sinais que caracterizam a presença de dois sistemas aromáticos 1,3,4-trissubstituídos. No caso da **R2**, o primeiro conjunto apresentou sinais em  $\delta_H$  6,69 (*d*, 1H,  $J$ = 2,00 Hz, H-2),  $\delta_H$  6,67 (*d*, 1H,  $J$ = 8,01 Hz, H-5) e  $\delta_H$  6,56 (*dd*, 1H,  $J$ = 8,01 e 2,00 Hz, H-6) enquanto o segundo os sinais em  $\delta_H$  7,04 (*d*, 1H,  $J$ = 2,03 Hz, H-2'),  $\delta_H$  6,95 (*dd*, 1H,  $J$ = 8,23 e 2,03 Hz, H-6') e  $\delta_H$  6,78 (*d*, 1H,  $J$ = 8,23 Hz, H-5'). No espectro de RMN  $^1H$  de **R2** também foi observado a presença de dois dubletos, em  $\delta_H$  7,59 (1H,  $J$ = 15,83 Hz, H-7') e  $\delta_H$  6,27 (1H,  $J$ = 15,83 Hz, H-8'), correspondentes aos hidrogênios de dupla ligação com configuração *trans*, característicos de um sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado conjugado a um anel aromático que, juntamente com os sinais de um dos dois sistemas aromáticos 1,3,4-trissubstituídos [ $\delta_H$  7,04 (*d*, 1H,  $J$ = 2,03 Hz, H-2'),  $\delta_H$  6,95 (*dd*, 1H,  $J$ = 8,23 e 2,03 Hz, H-6') e  $\delta_H$  6,78 (*d*, 1H,  $J$ = 8,23 Hz, H-5')], sugerem a presença da unidade cafeoil (ver estruturas da Figura 31). Adicionalmente, dois sinais característicos de hidrogênios anoméricos foram observados como dubletos em  $\delta_H$  5,33 (1H,  $J$ = 1,95 Hz, H-1''') e  $\delta_H$  4,38 (1H,  $J$ = 7,86 Hz, H-1''), o que indica a existência de duas unidades de açúcar nesta substância sendo que, de forma diferente de **R4**, nenhuma é da ramnose, uma vez que não se observa o dupletto característico da metila na posição 6''' deste açúcar em torno de  $\delta_H$  1,15 [113, 158].

Embora não se tenha observado claramente os sinais dos dois hidrogênios hidroximetilênicos não equivalentes na posição 8, como em **R4** (Figura 30E), devido a sobreposições de sinais com baixa intensidade, o multiplete observado em  $\delta_H$  2,79 (H-7) no espectro de RMN  $^1H$  de **R2** (Figura 33), integrando para 2H, sugerindo a presença de dois hidrogênios metilênicos ( $CH_2$ ) equivalentes, juntamente com os sinais em  $\delta_H$  6,69 (H-2),  $\delta_H$  6,67 (H-5) e  $\delta_H$  6,56 (H-6), indicaram a presença de uma unidade feniletanóide na estrutura desta substância (ver estruturas da Figura 31) [158, 160].

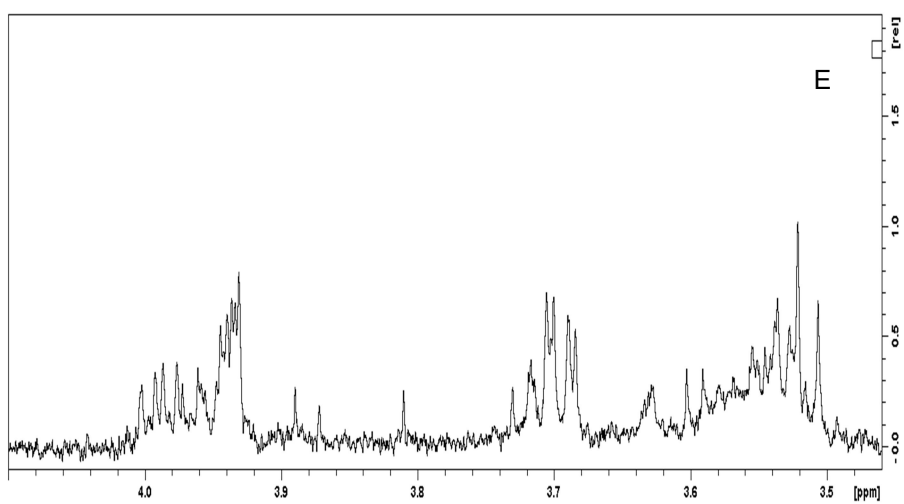
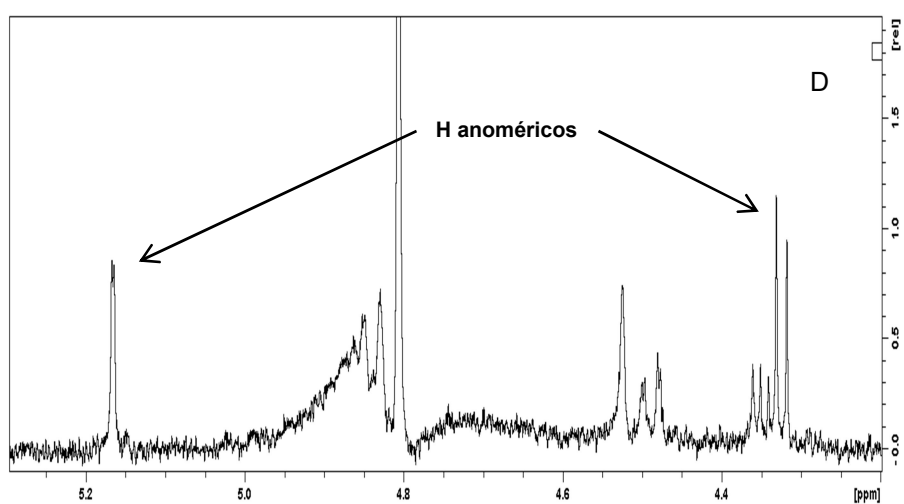
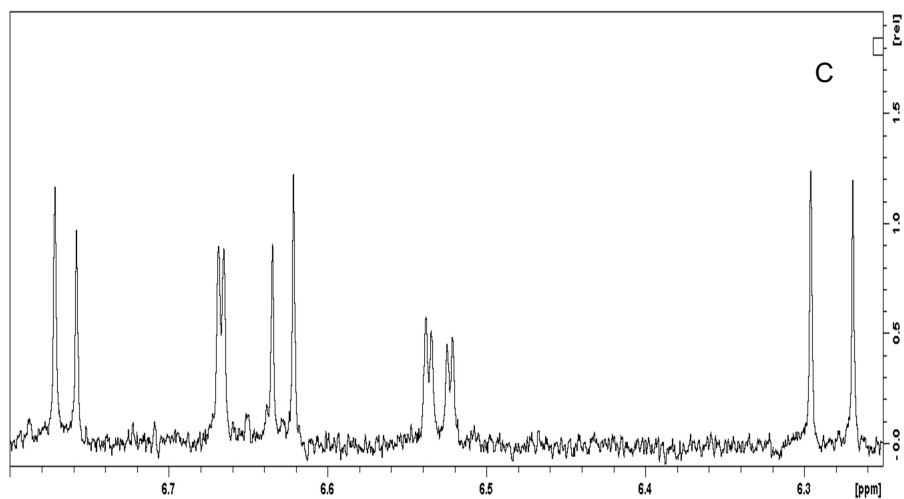
Contudo, devido a baixa concentração da substância **R2**, seu espectro de RMN  $^1H$  (Figura 33) apresentou sinais pouco resolvidos e de baixa intensidade, principalmente na região dos hidrogênios típicos de açúcares, difíceis de serem interpretados e, conseqüentemente, até o momento não foi possível a sua identificação estrutural completa. Em contrapartida, os resultados obtidos indicam que esta substância pertence a classe dos fenilpropanóides, assim como **R4**.

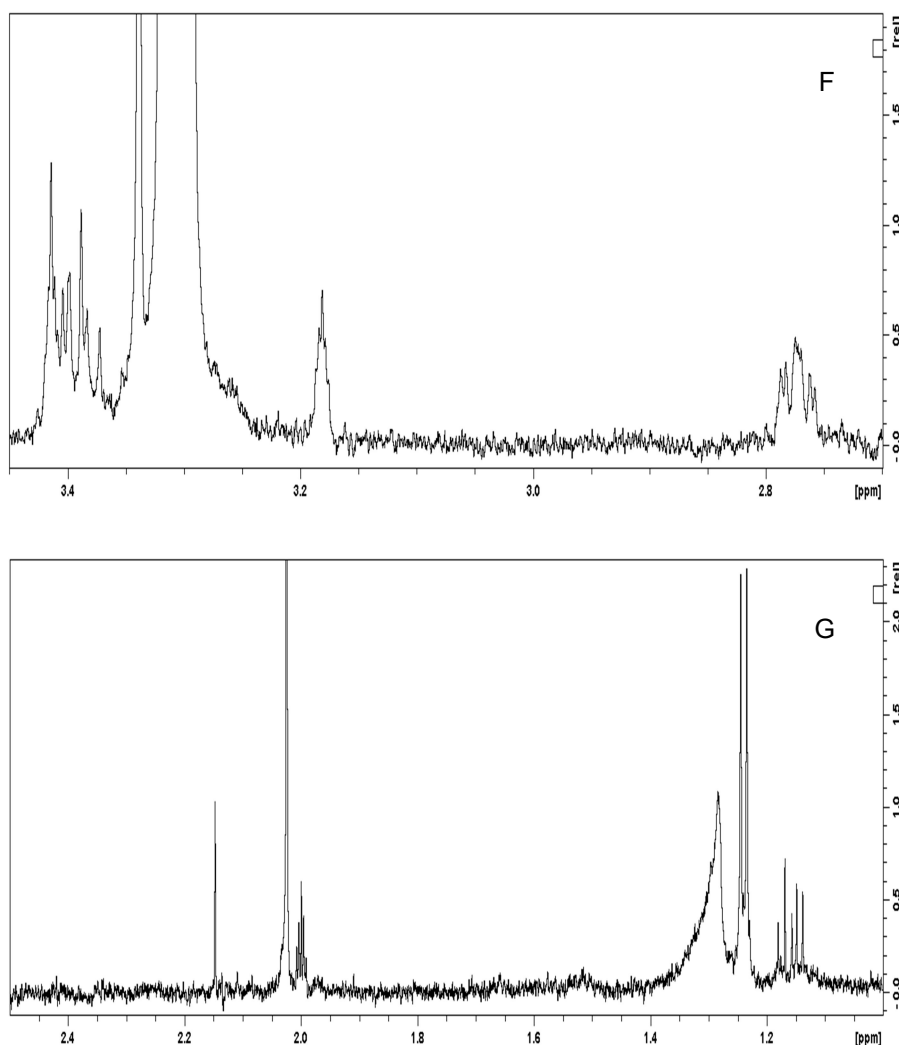
O espectro de RMN  $^1H$  da substância **R6** (Figura 34) apresentou sinais similares ao das substâncias **R2** e **R4**, como os dois conjuntos de sinais que caracterizam a presença de dois sistemas aromáticos 1,3,4-trissubstituídos: um em  $\delta_H$  6,67 (*d*, 1H,  $J = 2,10$  Hz, H-2),  $\delta_H$  6,62 (*d*, 1H,  $J = 8,08$  Hz, H-5) e  $\delta_H$  6,53 (*dd*, 1H,  $J = 8,08$  e  $2,10$  Hz, H-6) e outro em  $\delta_H$  7,03 (*d*, 1H,  $J = 2,07$  Hz, H-2'),  $\delta_H$  6,89 (*dd*, 1H,  $J = 8,18$  e  $2,07$  Hz, H-6') e  $\delta_H$  6,76 (*d*, 1H,  $J = 8,18$  Hz, H-5'); a presença de dois dubletos, em  $\delta_H$  7,56 (1H,  $J = 15,87$  Hz, H-7') e  $\delta_H$  6,28 (1H,  $J = 15,87$  Hz, H-8'), correspondentes aos hidrogênios de dupla ligação com configuração *trans*, formando um sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado conjugado a um anel aromático, sugerindo uma unidade cafeoil; além dos dois dubletos, característicos de hidrogênios anoméricos, em  $\delta_H$  5,17 (1H,  $J = 1,44$  Hz, H-1''') e  $\delta_H$  4,32 (1H,  $J = 7,89$  Hz, H-1''), o que indica a existência de duas unidades de açúcar nesta substância, com uma delas podendo ser a ramnose devido a presença do dubleto em  $\delta_H$  1,24 (3H,  $J = 6,28$  Hz), característico da metila na posição 6''' (ver estruturas mostradas na Figura 31) [113, 158].

**Figura 34:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) da substância **R6** (A, de  $\delta_{\text{H}}$  7,75 a 0,0) e suas expansões: (B) entre  $\delta_{\text{H}}$  7,75 e 6,82; (C) entre  $\delta_{\text{H}}$  6,80 e 6,25; (D) entre  $\delta_{\text{H}}$  5,30 e 4,20; (E) entre  $\delta_{\text{H}}$  4,10 e 3,46; (F) entre  $\delta_{\text{H}}$  3,45 e 2,70 e (G) de  $\delta_{\text{H}}$  2,50 a 1,00.









Os sinais observados no espectro de RMN <sup>1</sup>H de **R6** (Figura 34) em  $\delta_H$  2,77 (*m*, 2H, H-7), em  $\delta_H$  6,67 (H-2),  $\delta_H$  6,62 (H-5) e  $\delta_H$  6,53 (H-6) e os dois conjuntos de sinais entre  $\delta_H$  4,01-3,92 e entre  $\delta_H$  3,74-3,67, apesar de não observado claramente as suas multiplicidades, juntos sugerem a presença de uma unidade feniletanóide na estrutura desta substância, estando em concordância com os resultados descritos na literatura [158, 160] e com aqueles encontrados para a substância **R4**. No entanto foi observado um singlete em  $\delta_H$  3,34, que não foi observado em **R2** e **R4**, cuja integração não pôde ser obtida precisamente, visto que este sinal está parcialmente sobreposto ao sinal residual do MeOH-*d*<sub>4</sub>, dificultando esta atribuição.

Na Tabela 7 estão mostrados os dados de RMN <sup>1</sup>H das substâncias **R2**, **R4** e **R6** para a comparação entre elas.

**Tabela 7:** Comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  das substâncias **R2** e **R6** (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) com aqueles das substância **R4** (600 MHz, ACN- $d_3$ ).

	<b>R4</b>	<b>R2</b>	<b>R6</b>
<b>Posição</b>	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> )	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> )	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> )
<b>Unidade feniletanóide</b>			
<b>1</b>	-	-	-
<b>2</b>	6,76 (d; 2,02)	6,69 (d; 2,00)	6,67 (d; 2,10)
<b>3</b>	-	-	-
<b>4</b>	-	-	-
<b>5</b>	6,70 (d; 8,03)	6,67 (d; 8,01)	6,62 (d; 8,08)
<b>6</b>	6,59 (dd; 8,03; 2,02)	6,56 (dd; 8,01; 2,00)	6,53 (dd; 8,08; 2,10)
<b>8</b>	3,98 (dt; 9,85; 7,08) 3,68 (dt; 9,85; 7,08)	NA	4,01-3,92 (m) 3,74-3,67 (m)
<b>7</b>	2,77 (tl; 7,08)	2,79 (m)	2,77 (m)
<b>Unidade cafeoil</b>			
<b>1'</b>	-	-	-
<b>2'</b>	7,08 (d; 2,03)	7,04 (d; 2,03)	7,03 (d; 2,07)
<b>3'</b>	-	-	-
<b>4'</b>	-	-	-
<b>5'</b>	6,78 (d; 8,20)	6,78 (d; 8,23)	6,76 (d; 8,18)
<b>6'</b>	6,97 (dd; 8,20; 2,03)	6,95 (dd; 8,23; 2,03)	6,89 (dd; 8,18; 2,07)
<b>7'</b>	7,56 (d; 15,88)	7,59 (d; 15,83)	7,56 (d; 15,87)
<b>8'</b>	6,23 (d; 15,88)	6,27 (d; 15,83)	6,28 (d; 15,87)
<b>9'</b>	-	-	-
<b>Glicose</b>			
<b>1''</b>	4,33 (d; 7,92)	4,38 (d; 7,86)	4,32 (d; 7,89)
<b>2''</b>	3,38-3,33 (m)	NA	NA
<b>3''</b>	3,78 (t; 9,43)	NA	NA
<b>4''</b>	4,82 (t; 9,43)	NA	NA
<b>5''</b>	3,55-3,42 (m)	NA	NA
<b>6''</b>	3,55-3,42 (m, NC)	NA	NA
<b>Segunda unidade glicosídica</b>			
	<b>Ramnose</b>	<b>Não definida</b>	<b>Ramnose</b>
<b>1'''</b>	5,12 (d; 1,36)	5,33 (d; 1,95)	5,17 (d; 1,44)
<b>2'''</b>	3,77 (dd-m)	NA	NA
<b>3'''</b>	3,38-3,33 (m)	NA	NA
<b>4'''</b>	3,15 (t; 9,47)	NA	NA
<b>5'''</b>	3,55-3,42 (m)	NA	NA
<b>6'''</b>	1,05 (d; 6,25)	NA	1,24 (d; 6,28)

$\delta$ : Deslocamento químico (ppm); *m*: Multiplicidade; *J* (Hz): Correlações;

NA: Não Atribuído até o momento.

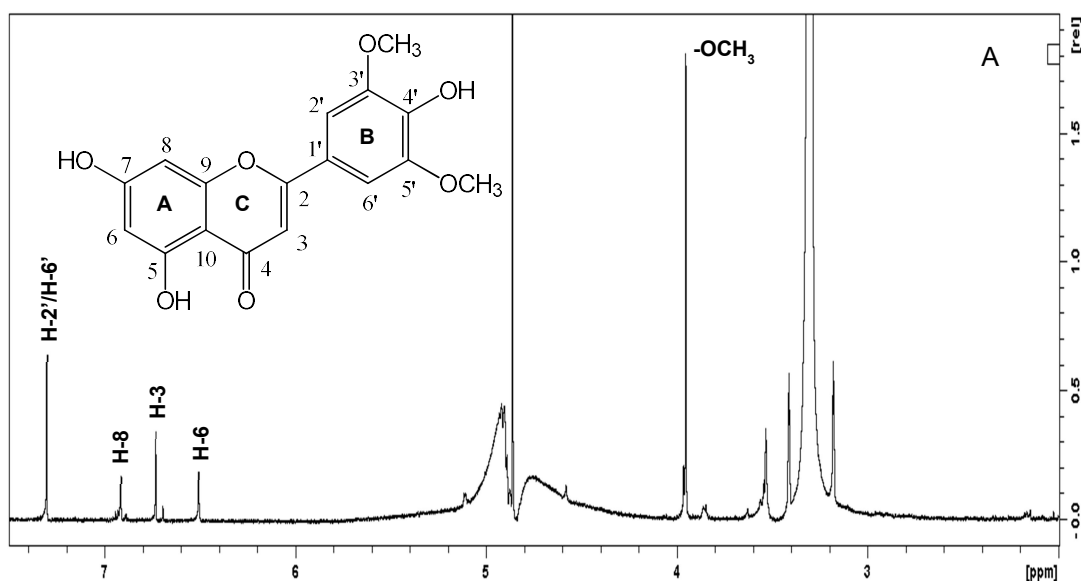
Os resultados de RMN  $^1\text{H}$  mostrados na Tabela 7 evidenciaram que, assim como **R2** e **R4**, a substância **R6** pertence a classe dos fenilpropanóide. Porém, até o momento, não foi possível a sua identificação estrutural completa devido a sua baixa concentração, resultando em um espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 34) com sinais pouco resolvidos e de baixa intensidade, principalmente na região dos hidrogênios típicos de açúcares, difíceis de serem interpretados. Este problema resultou em experimentos 2D (gCOSY, gHSQC e gHMBC) de

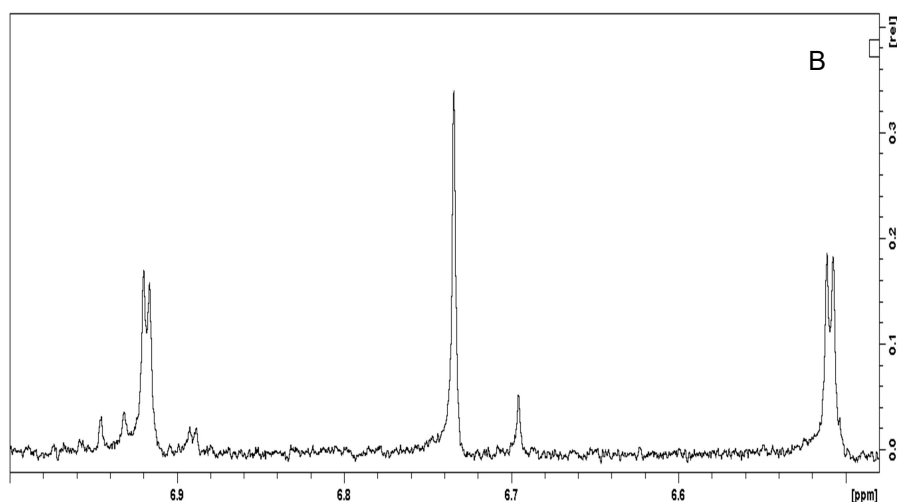
baixa qualidade, onde, de forma semelhante, também não permitiu a extração de informações conclusivas para a definição inequívoca da sua estrutura (dados não mostrados).

#### 4.4.3 Identificação da substância R9

A substância **R9** foi identificada como a flavona tricina, proposta com base em dados de RMN 1D e 2D (*g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC), cuja estrutura está mostrada juntamente com o seu espectro RMN  $^1\text{H}$  na Figura 35A. O espectro obtido foi calibrado através do sinal residual do MeOH- $d_4$ , utilizado para a dissolução desta amostra, em  $\delta_{\text{H}}$  3,30.

**Figura 35:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) da substância **R9** (A, de  $\delta_{\text{H}}$  7,50 a 2,00) e expansão entre  $\delta_{\text{H}}$  7,00 e 6,48 (B).

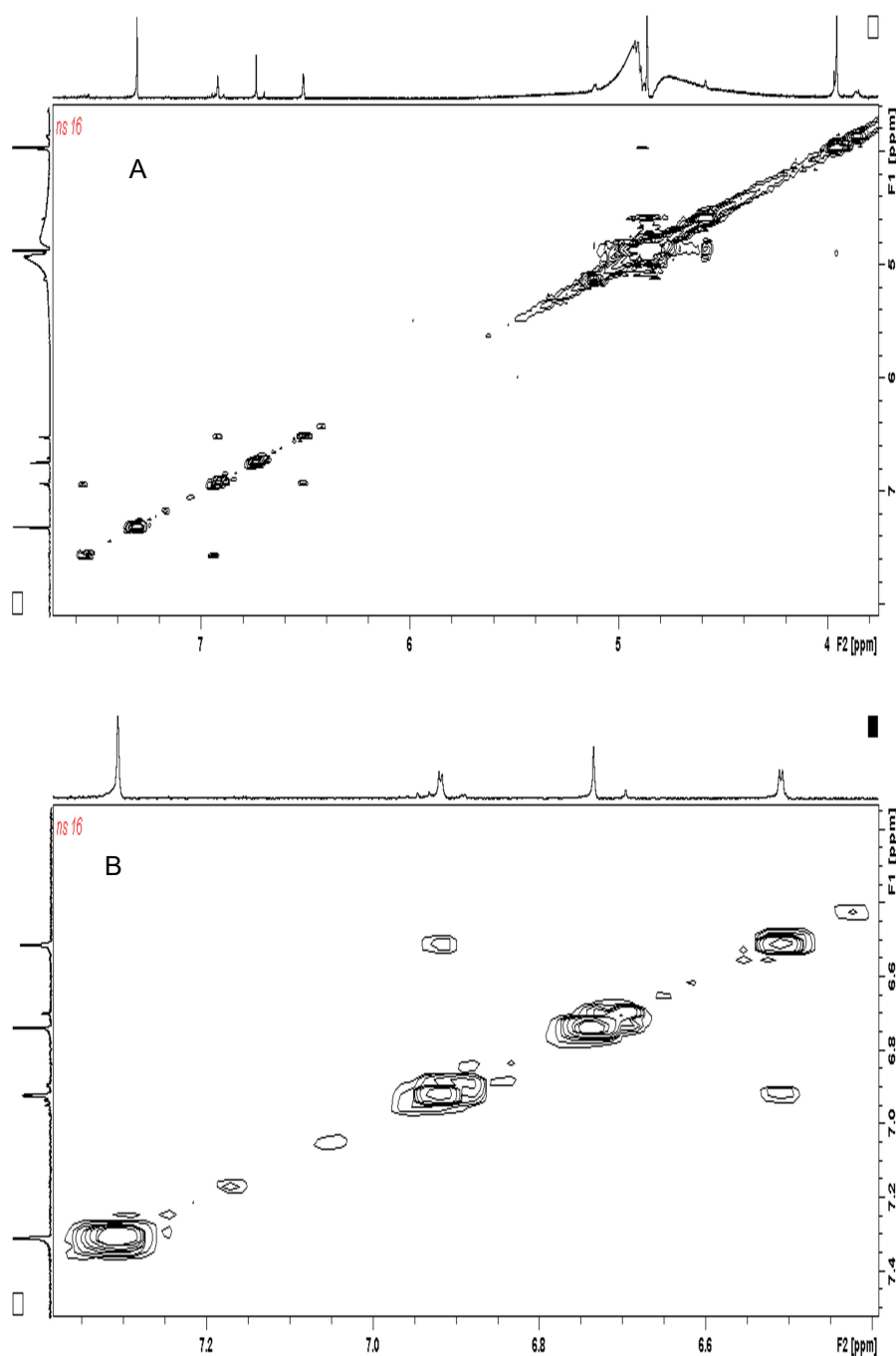




O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **R9** (Figura 35A) mostrou um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  6,73, característico do hidrogênio em C-3 de uma flavona. Além disso, foi possível observar a presença de dois dubletos, com constantes de acoplamento do tipo *meta* no valor de 2,16 Hz, em  $\delta_{\text{H}}$  6,92 (1H, H-8) e  $\delta_{\text{H}}$  6,51 (1H, H-6); um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  7,30 (2H), referente a dois hidrogênios equivalentes (H-2'/H-6') no anel aromático B, e outro singlete em  $\delta_{\text{H}}$  3,95 (6H), atribuído aos hidrogênios de duas metoxilas aromáticas equivalentes (-OCH<sub>3</sub>). Esse conjunto de sinais é característico de um derivado de flavona com substituições nas posições 5, 7, 3', 4' e 5', indicando o isolamento da tricina (5,7,4'-trihidroxí-3',5'-dimetóxi-flavona).

Na Figura 36 está mostrado o mapa de contornos gCOSY de **R9**. Através deste experimento foi possível confirmar o acoplamento ( $^4J$ ) entre os hidrogênios dos carbonos C-6 ( $\delta_{\text{H}}$  6,51) e C-8 ( $\delta_{\text{H}}$  6,92) do anel A da flavona.

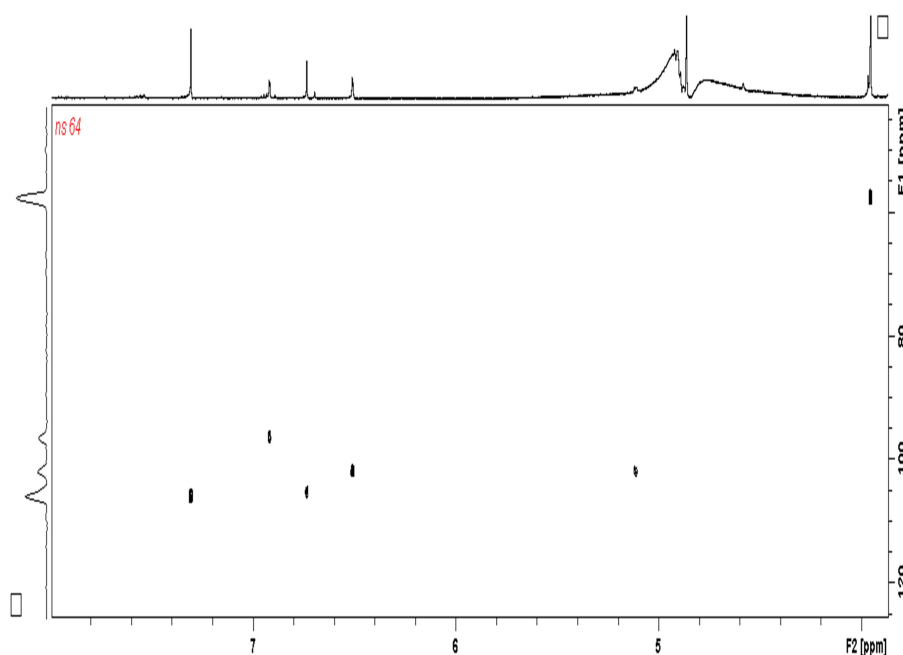
**Figura 36:** Mapa de contornos *g*COSY (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) da substância **R9** (A) e expansão (B).



Os dados de deslocamentos químicos de Carbono-13 foram atribuídos com base nos experimentos *g*HSQC e *g*HMBC, sendo possível observar, no total, 10 sinais diferentes.

A partir do mapa de contornos *g*HSQC (Figura 37) de **R9** foi possível se observar as seguintes correlações: entre o sinal em  $\delta_H$  3,95 (-OCH<sub>3</sub>) com o sinal de carbono em  $\delta_C$  57,5; entre os sinais em  $\delta_H$  6,92 (H-8) e  $\delta_H$  6,51 (H-6) com os sinais em  $\delta_C$  96,4 (C-8) e  $\delta_C$  101,8 (C-6), respectivamente; entre o sinal em  $\delta_H$  6,73 (H-3) com o sinal de carbono em  $\delta_C$  104,9 (C-3) e entre o sinal em  $\delta_H$  7,30 (H-2'/H-6') com aquele em  $\delta_C$  105,9 (C-2'/C-6').

**Figura 37:** Mapa de contornos *g*HSQC (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) da substância **R9**.

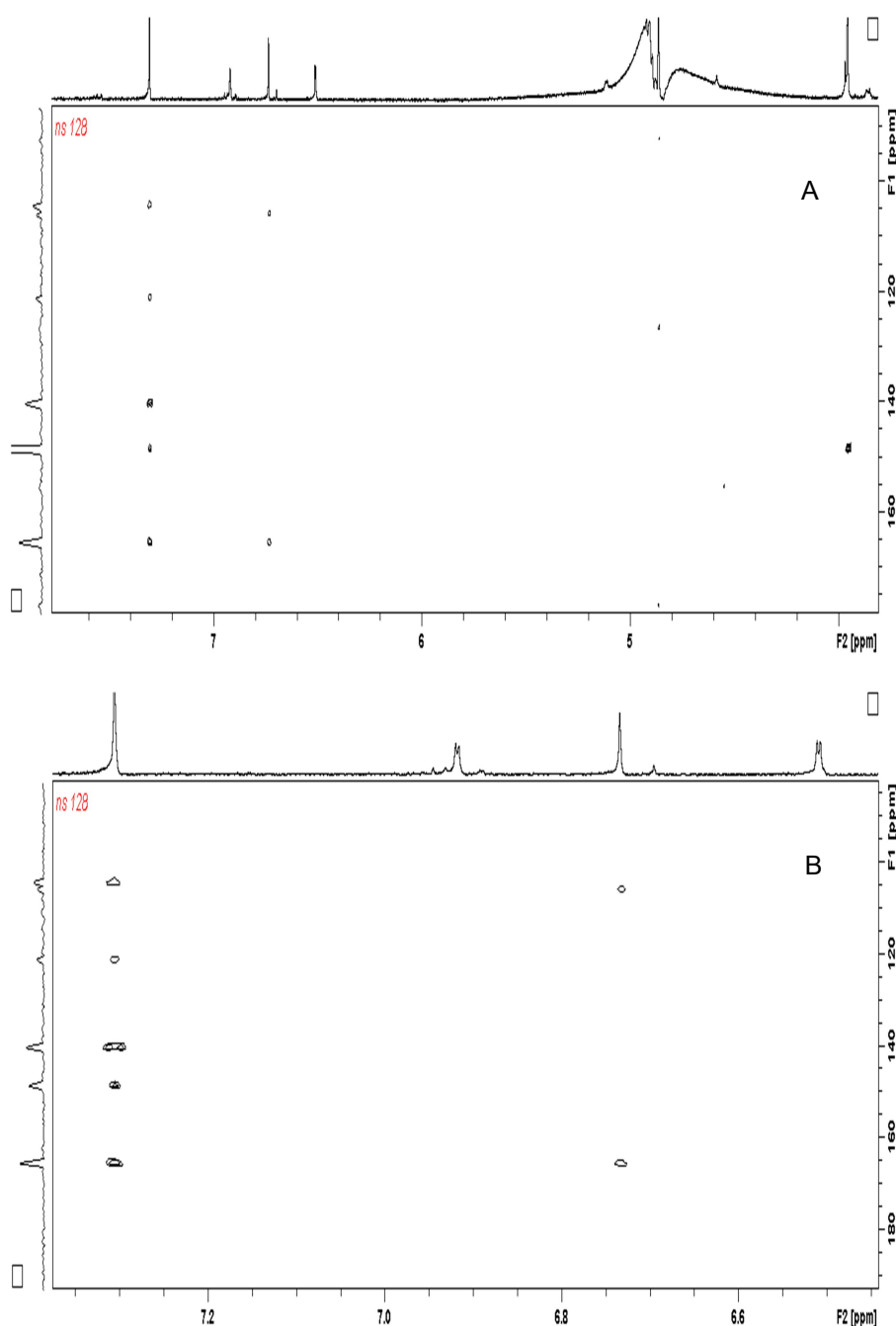


Assim, baseando-se nas correlações de *g*HSQC mencionadas (Figura 37), foi possível determinar os deslocamentos químicos de todos os carbonos hidrogenados presentes na estrutura. Estes resultados corroboram as atribuições anteriormente realizadas nesta seção e estão de acordo com os dados relatados na literatura para os sinais de Carbono-13 da flavona isolada (tricina) [157, 161, 162, 163, 164, 165].

Dados adicionais adquiridos através de mapa de contornos *g*HMBC para **R9** (Figura 38) mostraram as seguintes correlações: entre o sinal em  $\delta_H$  7,30 (s, H-2'/H-6') com os sinais dos carbonos em  $\delta_C$  165,4 (C-2, <sup>3</sup>*J*),  $\delta_C$  104,9 (C-3, <sup>4</sup>*J*),  $\delta_C$  121,1 (C-1', <sup>2</sup>*J*),  $\delta_C$  148,4 (C-3'/C-5', <sup>2</sup>*J*) e  $\delta_C$  140,1 (C-4', <sup>3</sup>*J*) e entre o sinal em  $\delta_H$  6,73 (s, H-3) com os sinais dos carbonos em  $\delta_C$  165,4 (C-2, <sup>2</sup>*J*) e  $\delta_C$  105,7 (C-10, <sup>3</sup>*J*). A correlação do singlete em  $\delta_H$  6,73 (H-3) com os carbonos

em  $\delta_C$  165,4 (C-2,  $^2J$ ) e  $\delta_C$  105,7 (C-10,  $^3J$ ) reforça a atribuição de que esse sinal é referente ao hidrogênio H-3 de uma flavona (Figura 35A). Além disso, a correlação do singlete em  $\delta_H$  3,95 (-OCH<sub>3</sub>), referente aos hidrogênios das metoxilas equivalentes, com o sinal de carbono em  $\delta_C$  148,4 (C-3'/C-5',  $^3J$ ) confirma a ligação das metoxilas nestes carbonos (C-3'/C-5').

**Figura 38:** Mapa de contornos gHMBC (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) da substância **R9** (A) e expansão (B), entre  $\delta_H$  7,62 e 6,92 com relação ao deslocamento químico do H.





Através das correlações obtidas por *g*HMBC (Figura 38) para **R9** foi possível atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos não hidrogenados, C-4' ( $\delta_C$  140,1), C-3'/C-5' ( $\delta_C$  148,4), C-2 ( $\delta_C$  165,4) e C-1' ( $\delta_C$  121,1). Todos estes dados de carbono-13 estão em concordância com aqueles relatados na literatura para este derivado de flavona [157, 161, 162, 163, 164, 165].

Os símbolos  $^2J$ ,  $^3J$ , e  $^4J$ , mencionados anteriormente e apresentados na Tabela 6, representam os acoplamentos de um hidrogênio à um carbono que estão à duas, três e quatro ligações entre si, respectivamente.

Os dados de RMN 1D e 2D, deslocamentos químicos e correlações, da substância **R9** também estão mostrados na Tabela 8.

**Tabela 8:** Dados de RMN 1D e 2D da substância **R9** (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>).

Posição	$\delta_C$ ( <i>g</i> HSQC e <i>g</i> HMBC)	$\delta_H$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> ; int.)	<i>g</i> COSY	<i>g</i> HMBC ( $^2J_{CH}$ , $^3J_{CH}$ , e $^4J_{CH}$ )
2	165,40 <sup>#</sup>	-		7,30 ( $^3J$ , H-2'/H-6'); 6,73 ( $^2J$ , H-3)
3	104,90*	6,73 (s; 1H)		7,30 ( $^4J$ , H-2'/H-6');
4	NO	-		-
5	NO	-		-
6	101,80*	6,51 (d; 2,16; 1H)	H-8	-
7	NO	-		-
8	96,40*	6,92 (d; 2,16; 1H)	H-6	-
9	NO	-		-
10	105,70 <sup>#</sup>	-		6,73 ( $^3J$ , H-3)
1'	121,10 <sup>#</sup>	-		7,30 ( $^2J$ , H-2'/H-6')
2'	105,90*	7,30 (s; 2H)		-
3'	148,40 <sup>#</sup>	-		7,30 ( $^2J$ , H-2'/H-6'); 3,95 ( $^3J$ , -OCH <sub>3</sub> )
4'	140,10 <sup>#</sup>	-		7,30 ( $^3J$ , H-2'/H-6');
5'	148,40 <sup>#</sup>	-		7,30 ( $^2J$ , H-2'/H-6'); 3,95 ( $^3J$ , -OCH <sub>3</sub> )
6'	105,90*	7,30 (s; 2H)		-
-OCH <sub>3</sub> (3' e 5')	57,50*	3,95 (s; 6H)		-

<sup>#</sup>*g*HMBC; \**g*HSQC;  $\delta$ : Deslocamento químico (ppm); *m*: Multiplicidade; *J* (Hz): Correlações; int.: Integração; NO: Não observado.

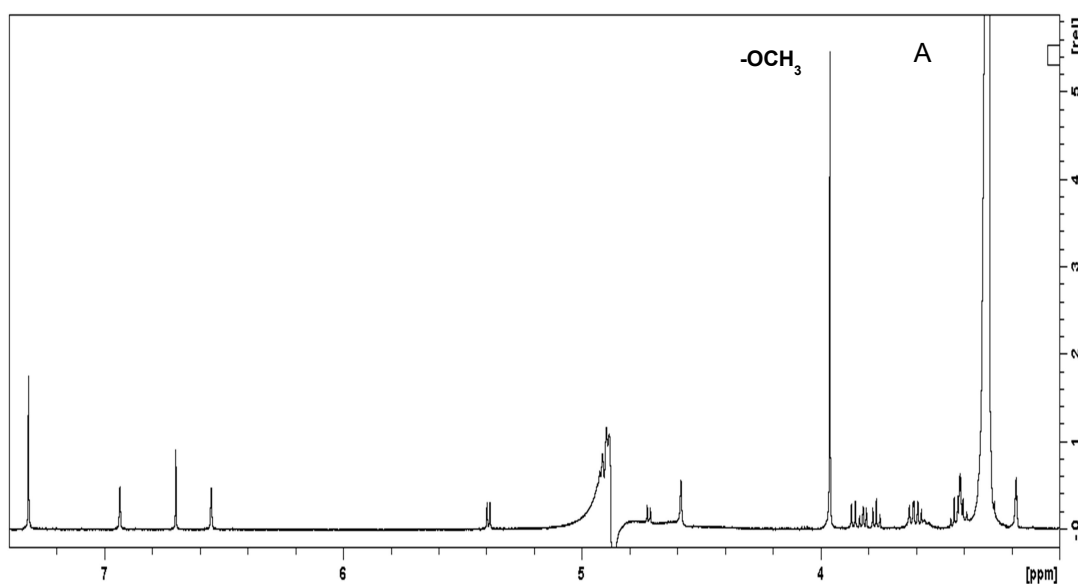
A partir dos dados obtidos e pela comparação com a literatura [157, 161, 162, 163, 164, 165], foi possível propor que a substância **R9** é a tricina, cuja estrutura está mostrada na Figura 35(A). Esta substância e outros flavonóides

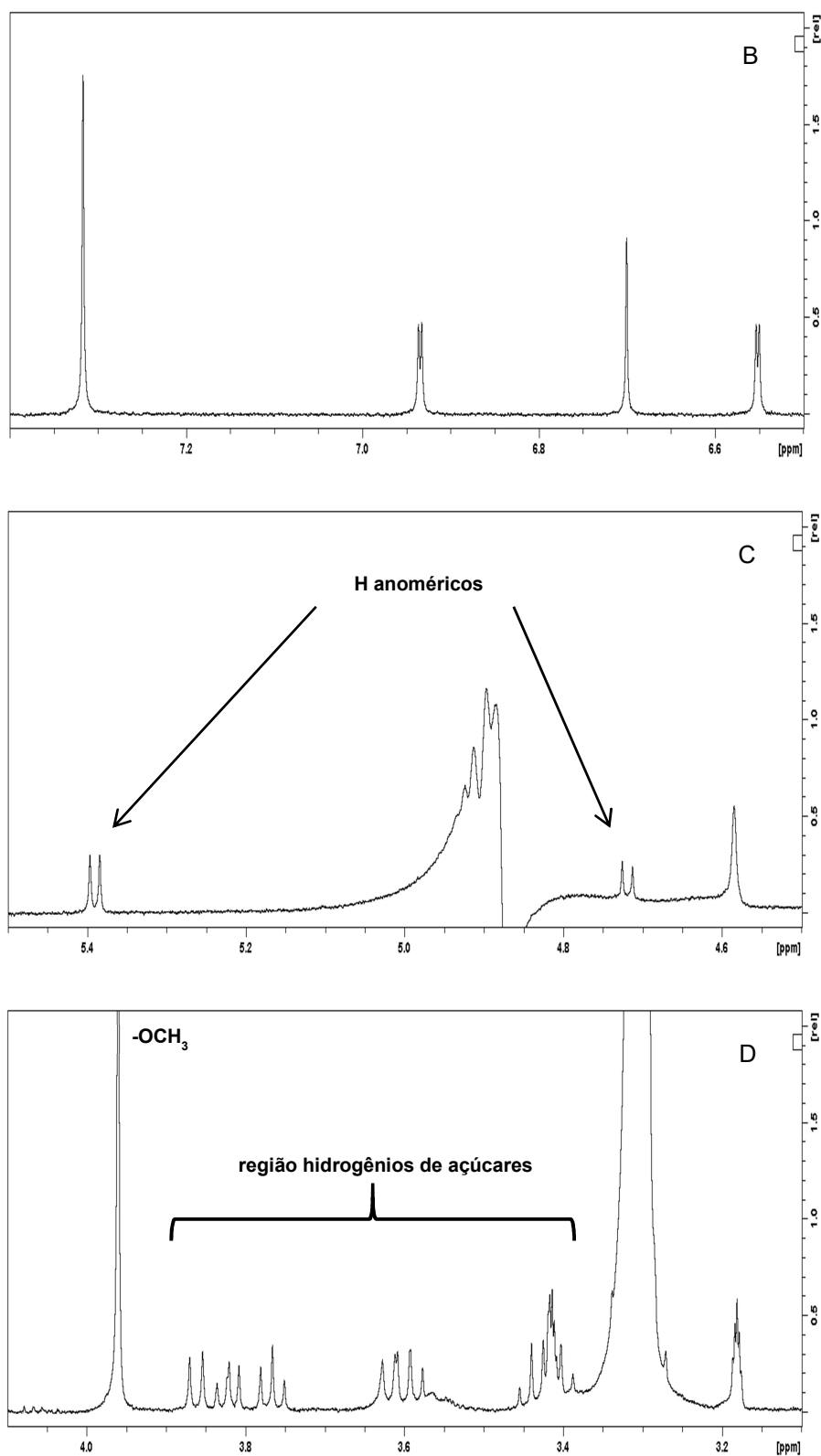
foram previamente identificados por LC-DAD-MS no extrato aquoso de *L. alba* em estudo realizado por Timóteo *et al.* [115].

#### 4.4.4 Identificação da substância R3

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **R3** (Figura 39) mostrou padrão de deslocamento químico e correlações, na região de hidrogênios aromáticos e olefínicos, bastante similar ao observado para a substância **R9** (Figura 35A). Este espectro foi obtido em metanol deuterado ( $\text{MeOH-}d_4$ ) e calibrado através do sinal residual deste solvente em  $\delta_{\text{H}}$  3,30.

**Figura 39:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) da substância **R3** (A, de  $\delta_{\text{H}}$  7,40 a 3,0) e suas expansões: (B) entre  $\delta_{\text{H}}$  7,40 e 6,50; (C) entre  $\delta_{\text{H}}$  5,50 e 4,50 e (D) entre  $\delta_{\text{H}}$  4,10 e 3,10.



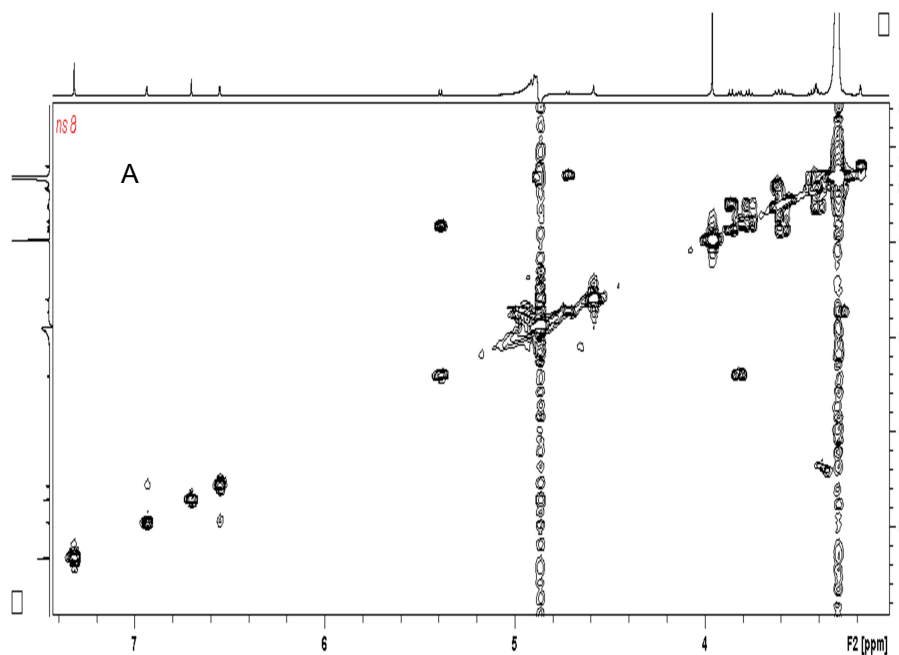


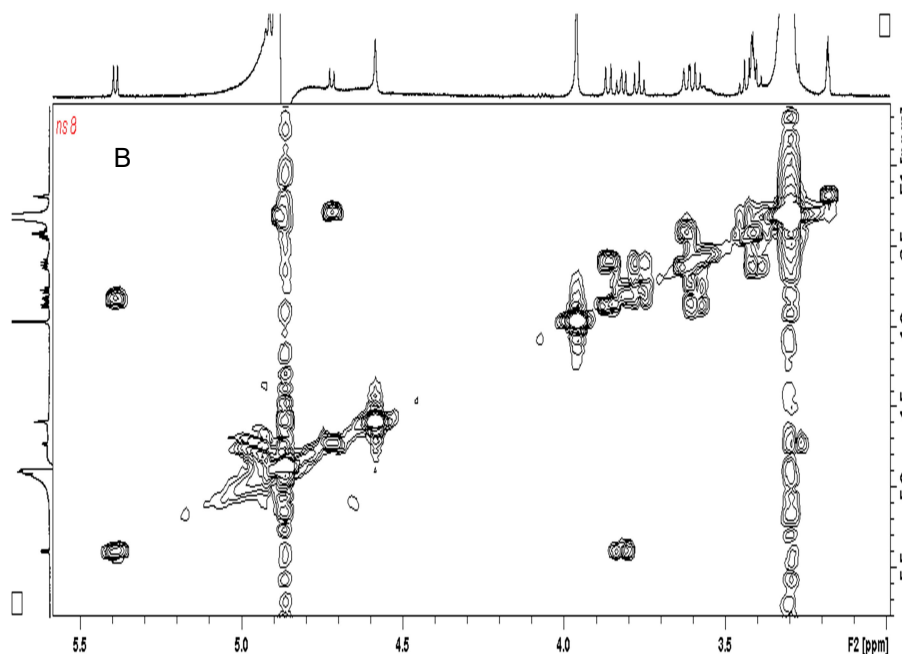
No caso da substância **R3**, foi observado um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  6,70, que sugere a presença do hidrogênio no carbono C-3 de uma flavona, além de dois dupletos correlacionados em *meta*, em  $\delta_{\text{H}}$  6,93 (1H,  $J = 2,13$  Hz, H-8) e  $\delta_{\text{H}}$  6,55

(1H,  $J = 2,13$  Hz, H-6), um singleto em  $\delta_H$  7,32 (2H), referente a dois hidrogênios equivalentes (H-2'/H-6') no anel aromático B, e outro singleto em  $\delta_H$  3,95 (6H), atribuído aos hidrogênios de duas metoxilas aromáticas equivalentes (-OCH<sub>3</sub>). No entanto, no espectro de RMN <sup>1</sup>H de **R3** e suas expansões, Figura 39(A, B, C e D), puderam ser observados sinais adicionais característicos de hidrogênios glicosídicos (região no espectro entre  $\delta_H$  3,90 e 3,20), confirmados pelos dois dubletos em  $\delta_H$  5,39 (1H,  $J = 7,43$  Hz, H-1'') e  $\delta_H$  4,72 (1H,  $J = 7,83$  Hz, H-1'''), referentes aos hidrogênios anoméricos. Esse conjunto de sinais é característico de um flavonóide diglicosilado com substituições nas posições 5, 7, 3', 4' e 5' com uma estrutura básica semelhante à flavona tricina (**R9**, Figura 35A).

A Figura 40 mostra o mapa de contornos gCOSY de **R3**. Através do COSY foi possível confirmar os acoplamentos (<sup>4</sup>J) entre os hidrogênios em  $\delta_H$  6,93 (H-8) e  $\delta_H$  6,55 (H-6), e de cada um dos hidrogênios anoméricos, em  $\delta_H$  5,39 (H-1'') e  $\delta_H$  4,72 (H-1'''), com os seus respectivos hidrogênios vizinhos, H-2'' e H-2''', que estão na região entre  $\delta_H$  3,90 e 3,20.

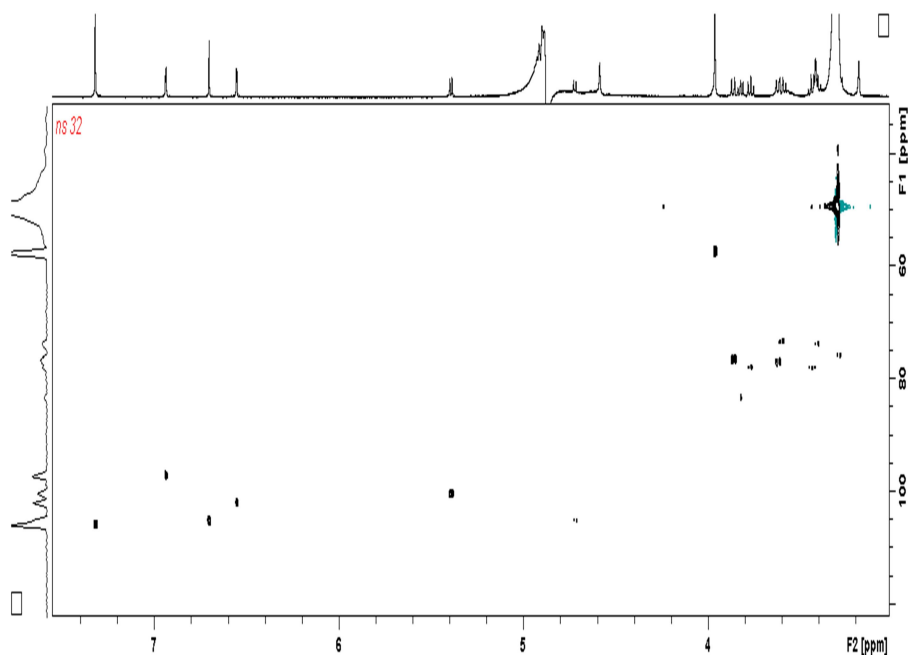
**Figura 40:** Mapa de contornos gCOSY (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) da substância **R3** (A) e expansão (B).





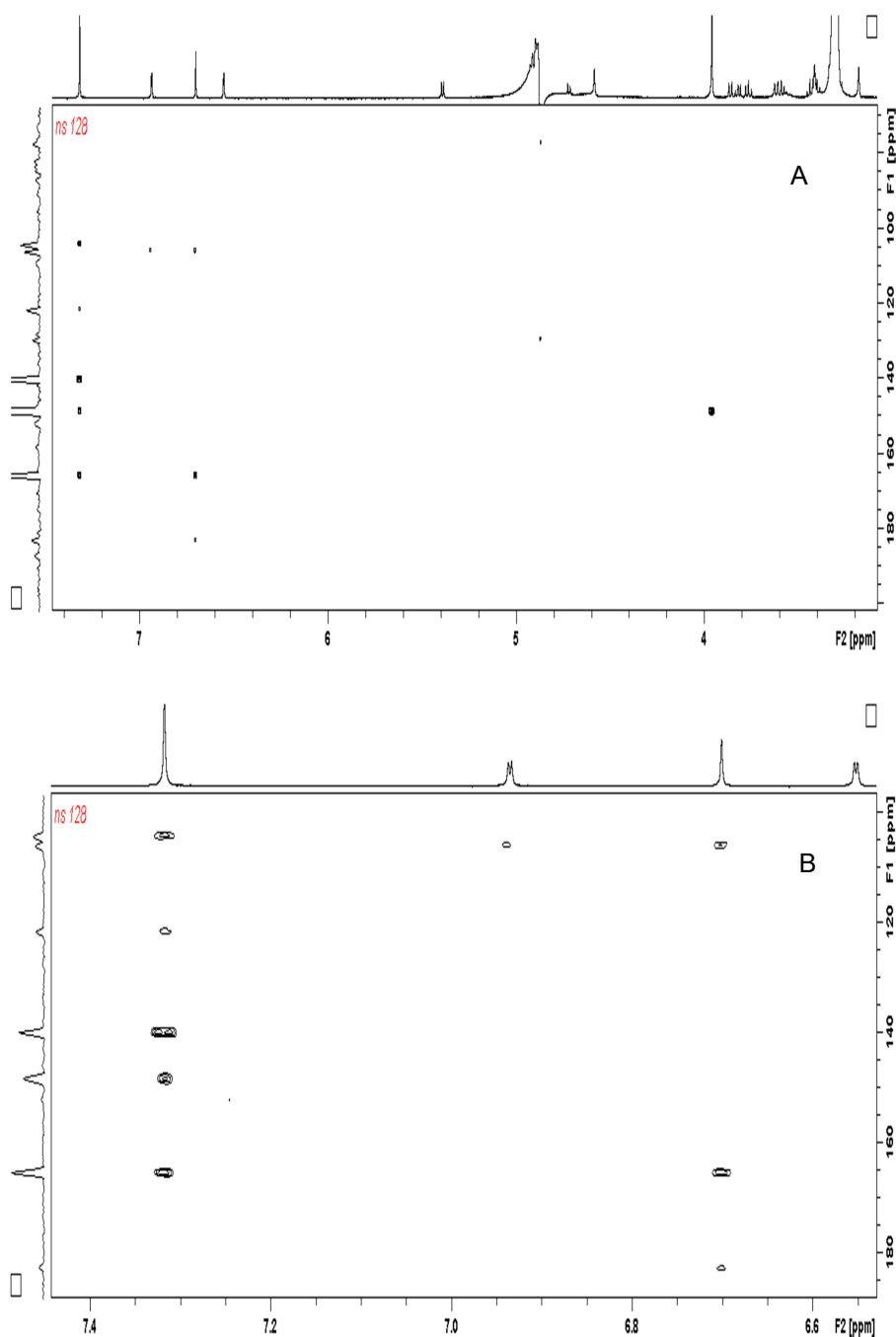
Além disso, através das correlações observadas no mapa de contornos gHSQC de **R3** (Figura 41), foi possível verificar a presença dos sinais de carbonos hidrogenados típicos de anéis aromáticos em  $\delta_C$  97,1 (C-8),  $\delta_C$  101,9 (C-6) e  $\delta_C$  105,8 (C-2'/C-6'); do sinal do carbono olefínico em  $\delta_C$  105,0 (C-3); do carbono referente às duas metoxilas equivalentes (-OCH<sub>3</sub>, C-3' e C-5') em  $\delta_C$  57,4 e dos sinais dos carbonos em  $\delta_C$  100,3 (C-1'') e em  $\delta_C$  104,9 (C-1'''), que se correlacionam com os hidrogênios anoméricos em  $\delta_H$  5,39 (H-1'') e  $\delta_H$  4,72 (H-1'''), respectivamente. Estes valores estão de acordo com aqueles encontrados na literatura para a tricina glicosilada [166, 167].

**Figura 41:** Mapa de contornos *g*HSQC (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) da substância **R3**.



Adicionalmente, através do mapa de contornos *g*HMBC de **R3** (Figura 42), foi possível observar as seguintes correlações: entre o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  7,32 (s, H-2'/H-6') com os sinais dos carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  165,4 (C-2,  $^3J$ ),  $\delta_{\text{C}}$  104,9 (C-3,  $^4J$ ),  $\delta_{\text{C}}$  121,1 (C-1',  $^2J$ ),  $\delta_{\text{C}}$  148,4 (C-3'/C-5',  $^2J$ ) e  $\delta_{\text{C}}$  140,1 (C-4',  $^3J$ ) e entre o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  6,70 (s, H-3) com os sinais dos carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  165,4 (C-2,  $^2J$ ) e  $\delta_{\text{C}}$  105,7 (C-10,  $^3J$ ).

**Figura 42:** Mapa de contornos *g*HMBC (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) da substância **R3** (A) e expansão (B).



Com base no *g*HMBC de **R3** (Figura 42), foi possível observar que a correlação do singlete em  $\delta_{\text{H}}$  6,70 (H-3) com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  165,4 (C-2,  $^2J$ ) e  $\delta_{\text{C}}$  105,7 (C-10,  $^3J$ ) reforça a atribuição de que esse sinal é referente ao hidrogênio (H-3) de uma flavona. Além disso, a correlação do singlete em  $\delta_{\text{H}}$  3,95 (-OCH<sub>3</sub>) com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  148,4 (C-3'/C-5',  $^3J$ ) confirma a ligação das metoxilas nestes carbonos (C-3'/C-5').

Os dados de deslocamentos químicos de carbono-13 foram atribuídos com base nas correlações observadas nos mapas de contornos *g*HSQC e *g*HMBC, sendo possível observar, no total, 21 sinais diferentes, dos quais apenas 13 estavam relacionados aos seus respectivos hidrogênios e foram atribuídos na estrutura proposta, baseando-se nos dados descritos na literatura [166, 167]. Os dados de deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbono-13, bem como algumas correlações observadas, até então, para a substância **R3** estão mostrados na Tabela 9.

**Tabela 9:** Dados de RMN 1D e 2D da substância **R3** (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>).

Posição	$\delta_c$ ( <i>g</i> HSQC e <i>g</i> HMBC)	$\delta_H$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> ; Int.)	<i>g</i> COSY	<i>g</i> HMBC ( <sup>2</sup> <i>J</i> <sub>CH</sub> , <sup>3</sup> <i>J</i> <sub>CH</sub> , e <sup>4</sup> <i>J</i> <sub>CH</sub> )
<b>2</b>	165,40 <sup>#</sup>	-	-	7,32 ( <sup>3</sup> <i>J</i> , H-2'/H-6'); 6,70 ( <sup>2</sup> <i>J</i> , H-3)
<b>3</b>	105,00*	6,70 (s; 1H)	-	7,32 ( <sup>4</sup> <i>J</i> , H-2'/H-6');
<b>4</b>	182,90 <sup>#</sup>	-	-	6,70 ( <sup>2</sup> <i>J</i> , H-3)
<b>5</b>	NO	-	-	-
<b>6</b>	101,90*	6,55 (d; 2,13; 1H)	H-8	-
<b>7</b>	NO	-	-	-
<b>8</b>	97,10*	6,93 (d; 2,13; 1H)	H-6	-
<b>9</b>	NO	-	-	-
<b>10</b>	105,90 <sup>#</sup>	-	-	6,93 ( <sup>3</sup> <i>J</i> , H-8); 6,70 ( <sup>3</sup> <i>J</i> , H-3)
<b>1'</b>	121,30 <sup>#</sup>	-	-	7,32 ( <sup>2</sup> <i>J</i> , H-2'/H-6')
<b>2'</b>	105,80*	7,32 (s; 2H)	-	-
<b>3'</b>	148,40 <sup>#</sup>	-	-	7,32 ( <sup>2</sup> <i>J</i> , H-2'/H-6'); 3,96 ( <sup>3</sup> <i>J</i> , -OCH <sub>3</sub> )
<b>4'</b>	139,90 <sup>#</sup>	-	-	7,32 ( <sup>3</sup> <i>J</i> , H-2'/H-6');
<b>5'</b>	148,40 <sup>#</sup>	-	-	7,32 ( <sup>2</sup> <i>J</i> , H-2'/H-6'); 3,96 ( <sup>3</sup> <i>J</i> , -OCH <sub>3</sub> )
<b>6'</b>	105,80*	7,32 (s; 2H)	-	-
<b>-OCH3 (3' e 5')</b>	57,4*	3,96 (s; 6H)	-	-
<b>1''</b>	100,30*	5,39 (d; 7,43; 1H)	NA	NO
<b>2''</b>	NA	3,90 - 3,20, NA	NA	NA
<b>3''</b>	NA	3,90 - 3,20, NA	NA	NA
<b>4''</b>	NA	3,90 - 3,20, NA	NA	NA
<b>5''</b>	NA	3,90 - 3,20, NA	NA	NA
<b>6''</b>	NA	3,90 - 3,20, NA	NA	NA
<b>1'''</b>	104,90*	4,72 (d; 7,83; 1H)	NA	NO
<b>2'''</b>	NA	3,90 - 3,20, NA	NA	NA
<b>3'''</b>	NA	3,90 - 3,20, NA	NA	NA
<b>4'''</b>	NA	3,90 - 3,20, NA	NA	NA
<b>5'''</b>	NA	3,90 - 3,20, NA	NA	NA
<b>6'''</b>	NA	NA	NA	NA

<sup>#</sup>*g*HMBC; \**g*HSQC;  $\delta$ : Deslocamento químico (ppm); *m*: Multiplicidade; *J* (Hz):

Correlações; int.: Integração; **NO**: Não observado; **NA**: Não atribuídos até o momento.



Todos os resultados obtidos corroboram a suposição de que a substância **R3** seja um derivado da tricina diglicosilada sem, contudo, saber exatamente a posição na qual estas duas unidades glicosídicas estão ligadas [166, 167]. Assim, a substância **R3** não teve, ainda, a sua estrutura totalmente elucidada devido a complexidade do seu espectro e a sua baixa concentração para a realização dos experimentos de RMN 2D de qualidade, além da sobreposição de alguns sinais referentes a amostra com aqueles do solvente deuterado utilizado.

A Tabela 10 mostra a comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (através de mapa de contornos gHSQC e gHMBC) obtidos até o momento para a substância **R3** com aqueles descritos na literatura para a tricina com duas unidades de açúcar em sua estrutura.

**Tabela 10:** Comparação dos dados de RMN 1D e 2D da substância **R3** (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) com aqueles descritos na literatura.

	<b>R3</b>		<b>Oliveira et al. [166]<sup>a</sup></b>		<b>Yang et al. [167]<sup>b</sup></b>	
<b>Posição</b>	<b><math>\delta_{\text{C}}</math></b>	<b><math>\delta_{\text{H}}</math> (m; J)</b>	<b><math>\delta_{\text{C}}</math></b>	<b><math>\delta_{\text{H}}</math> (m; J)</b>	<b><math>\delta_{\text{C}}</math></b>	<b><math>\delta_{\text{H}}</math> (m; J)</b>
2	165,40 <sup>#</sup>		166,71	-	164,10	-
3	105,00*	6,70 (s)	105,14	6,75 (sl)	103,70	7,07 (s)
4	182,90 <sup>#</sup>		184,04	-	182,00	-
5	NO		158,98	-	161,00	-
6	101,90*	6,55 (d; 2,13)	101,16	6,54 (d; 1,80)	99,40	6,52 (d; 2,0)
7	NO		166,71	-	162,50	-
8	97,14*	6,93 (d; 2,13)	96,55	6,81 (sl)	95,70	7,01 (d; 2,0)
9	NO		164,80	-	156,70	-
10	105,90 <sup>#</sup>		104,64	-	105,40	-
1'	121,30 <sup>#</sup>		122,64	-	120,10	-
2'	105,80*	7,32 (s)	105,71	7,28 (s)	104,70	7,37 (s)
3'	148,40 <sup>#</sup>		149,81	-	148,10	-
4'	139,90 <sup>#</sup>		140,84	-	140,00	-
5'	148,40 <sup>#</sup>		149,81	-	148,10	-
6'	105,80*	7,32 (s)	105,71	7,28 (s)	104,70	7,37 (s)
O-CH3 (3' e 5')	57,40*	3,96 (s)	57,34	3,97 (sl)	56,30	3,89 (s)
1''	100,30*	5,39 (d; 7,43)	102,26	5,09 (d; 7,50)	98,30	5,33 (d; 5,7)
2''	NA	3,90 - 3,20 (NA)	74,90	3,42-4,03	82,50	3,55 (m)
3''	NA	3,90 - 3,20 (NA)	78,02	3,42-4,03	77,00	3,19 (m)
4''	NA	3,90 - 3,20 (NA)	71,41	3,42-4,03	70,90	3,44 (m)
5''	NA	3,90 - 3,20 (NA)	77,31	3,42-4,03	74,60	3,98 (m)
6''	NA	3,90 - 3,20 (NA)	67,54	3,42-4,03	170,00	NO
1'''	104,90*	4,72 (d; 7,83)	101,59	4,48 (d; 1,5)	104,70	4,48 (d; 7,90)
2'''	NA	3,90 - 3,20 (NA)	72,21	3,42-4,03	74,60	2,99 (m)
3'''	NA	3,90 - 3,20 (NA)	72,53	3,42-4,03	76,10	3,16 (m)
4'''	NA	3,90 - 3,20 (NA)	74,17	3,42-4,03	69,60	3,10 (m)
5'''	NA	3,90 - 3,20 (NA)	69,92	3,42-4,03	75,00	3,55 (m)

Continuação da Tabela 10

6"	NA	NA	18,17	1,17 (d; 6,06)	60,60	3,53 (m) e 3,44 (m)
----	----	----	-------	----------------	-------	------------------------

<sup>#</sup>**g**HMBc; <sup>\*</sup>**g**HSQC; **δ**: Deslocamento químico (ppm); **m**: Multiplicidade; **J** (Hz): Correlações;  
**NO**: Não observado; **NA**: Não atribuídos até o momento.

<sup>a</sup>tricina-7-O-rutinosídeo (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>);

<sup>b</sup>tricina glicopiranosil-glicuronopiranosídeo (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).

#### 4.5 Estudo de citotoxicidade em linhagens de células tumorais *in vitro*

As análises de citotoxicidade *in vitro* fazem parte de um *screening* inicial para verificar o potencial anticâncer dos extratos de *L. alba* frente a linhagens de células tumorais.

A Tabela 11 apresenta os resultados do ensaio de citotoxicidade das amostras testadas em concentração única (50 µg/mL) para os extratos das folhas de *L. alba*. As amostras preparadas por infusão são referenciadas como IV (coleta de verão) e II (coleta de inverno). Em contrapartida, as amostras preparadas por maceração (hidroalcoólicas) são referenciadas como HV (coleta de verão) e HI (coleta de inverno).

**Tabela 11:** Porcentagem de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais.

Amostras	Porcentagem de Inibição		Amostras	Porcentagem de Inibição	
	HepG2	HL-60		HepG2	HL-60
<b>01IV</b>	5,13 ± 1,63	7,05 ± 1,75	<b>01HV</b>	4,13 ± 0,24	51,37 ± 4,65
<b>02IV</b>	1,13 ± 0,67	31,61 ± 5,81	<b>02HV</b>	1,17 ± 1,54	12,36 ± 4,16
<b>24IV</b>	13,30 ± 1,23	36,58 ± 5,21	<b>24HV</b>	9,97 ± 6,48	52,51 ± 5,54
<b>32IV</b>	7,47 ± 3,33	23,03 ± 7,60	<b>32HV</b>	1,96 ± 5,09	39,58 ± 9,47
<b>39IV</b>	3,12 ± 1,13	15,94 ± 1,29	<b>39HV</b>	7,10 ± 3,12	30,12 ± 1,91
<b>54IV</b>	5,29 ± 1,65	24,65 ± 8,13	<b>54HV</b>	3,31 ± 1,09	26,69 ± 3,60
<b>01II</b>	4,27 ± 0,18	47,81 ± 5,01	<b>01HI</b>	7,54 ± 2,27	7,41 ± 2,58
<b>02II</b>	13,16 ± 4,75	49,30 ± 2,04	<b>02HI</b>	6,98 ± 0,90	41,66 ± 6,54
<b>24II</b>	21,04 ± 7,70	27,26 ± 7,10	<b>24HI</b>	7,12 ± 6,87	40,10 ± 8,37

Continuação da Tabela 11

<b>32II</b>	18,92 ± 5,55	27,39 ± 9,51	<b>32HI</b>	1,44 ± 3,46	24,77 ± 7,13
<b>39II</b>	5,40 ± 2,57	21,04 ± 4,62	<b>39HI</b>	17,07 ± 6,83	49,59 ± 3,47
<b>54II</b>	14,58 ± 4,06	30,30 ± 4,71	<b>54HI</b>	17,84 ± 7,54	40,77 ± 7,63
<b>DOX</b>	<b>87,91 ± 5,56</b>	<b>91,28 ± 4,02</b>			

Na Tabela 11 estão mostrados os percentuais de inibição celular  $\pm$  erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em triplicata pelo método do alamar blue após 72 horas de exposição com as células HL-60 (leucemia humana) e HepG2 (carcinoma hepatocelular humano). A Doxorrubicina (DOX) foi usada como controle positivo. Apenas as amostras que são capazes de inibir pelo menos 75% da proliferação são consideradas ativas. Desta forma, com base nos resultados obtidos, nenhuma das amostras testadas foi considerada ativa, principalmente quando comparadas aos resultados alcançados pela Doxorrubicina, que apresentou efeito inibidor de aproximadamente 88 e 91% com relação as linhagens HepG2 e HL60, respectivamente.

Apesar do baixo efeito inibidor demonstrado pelos extratos de *L. alba*, é possível ressaltar os resultados exibidos pelos extratos **01II**, **01HV**, **02II**, **02HI**, **24HI**, **24HV**, **39HI** e **54HI**, que se destacaram em relação aos demais no combate as células HL-60, com percentual de inibição que variou de aproximadamente 40,0 a 52,0% (Tabela 11). Entretanto, entre os extratos testados frente as células HepG2, nenhuma apresentou percentual de inibição acima de 22%.

Os resultados mais promissores apresentados por estes extratos podem, supostamente, estar relacionados a presença dos compostos referentes às bandas cromatográficas que eluem nos tempos de retenção de 3,90 e 30,2 minutos (Figura 28), sendo mais características destas amostras, ambas apresentando valores de *loadings* negativos na PC2; valores positivos de *loadings* na PC1 para a banda em 30,2 minutos e valor próximo de zero em PC1 para a banda em 3,90 minutos, esta última não apresentando grande

importância para a composição da PC1 (Figura 26). A banda em 30,2 minutos corresponde a um derivado de fenilpropanóide, substância **R4**, previamente relatada na seção 4.4.

Adicionalmente, uma vez que a amostra **02II** está correlacionada, dentre outras, com a banda que elui em 29,5 minutos, pode-se supor que tal substância pode ter contribuído para a atividade apresentada por esta amostra. A banda cromatográfica em 29,5 minutos corresponde a um derivado de flavonóide (substância **R3**), como previamente relatado na seção 4.4.

Tanto os fenilpropanóides quanto os flavonóides são reconhecidos e descritos na literatura por possuírem importantes atividades biológicas, tais como antioxidante e antitumoral [115, 168, 169].

De modo geral, as diferenças encontradas nas atividades citotóxicas entre os extratos testados, apesar de não serem considerados ativos, possivelmente está relacionada as diferenças nas suas composições químicas. Desta forma, pode-se supor que essas diferenças químicas estão relacionadas a três fatores principais: por se tratar de plantas diferentes (acessos diferentes); formas de preparo diferentes (infusão e maceração) e épocas de coletas distintas (verão e inverno). Estes fatores são relatados na literatura como variáveis que podem afetar a composição química de plantas medicinais e suas preparações, influenciando no seu potencial biológico [9, 15, 50, 60].

Atualmente sabe-se que, muitas vezes, a atividade biológica apresentada por um determinado extrato vegetal pode estar relacionada a um grupo de compostos ou, ainda, a uma substância em particular existente neste extrato. Assim, frações ou compostos isolados a partir de uma determinada preparação vegetal podem proporcionar atividades farmacológicas mais intensas do que aquelas apresentadas pelo extrato bruto [126, 129].

Com base neste pressuposto, a realização de fracionamentos dos extratos obtidos neste trabalho (ao menos dos mais ativos) através de partição líquido-líquido, por exemplo, torna-se uma estratégia importante na busca por preparações com potencial antitumoral, que pode resultar em frações com maiores atividades frente as linhagens celulares avaliadas quando comparadas aos seus respectivos extratos brutos, visto que esta espécie apresenta em sua

composição química (seção 1.5.2) substâncias que podem exercer efeitos antitumorais como fenilpropanóides glicosilados e flavonóides [168, 169].

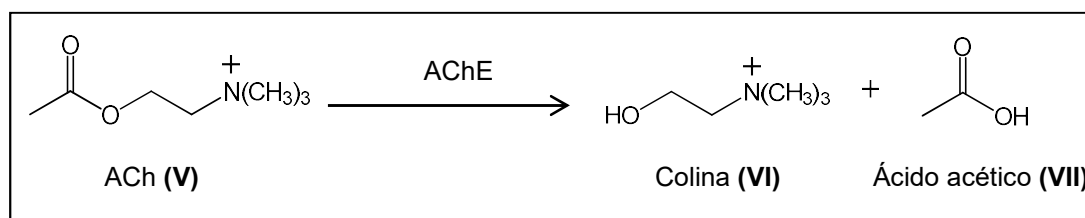
Estudos prévios com diferentes flavonóides [169, 170] e fenilpropanóides glicosilados [171] mostraram a importante atividade antiproliferativa destes compostos frente as células tumorais de cólon. Estes estudos destacam o potencial anticarcinogênico dessas duas classes de compostos, as quais são encontradas em várias espécies do gênero *Lippia* (Revisão da literatura, seção 1.5.1).

#### 4.6 Estudo da atividade de inibição enzimática *in vitro*

As análises de inibição enzimática *in vitro* fazem parte de um triagem inicial para verificar o potencial de inibição da enzima AChE dos extratos das folhas de *L. alba*.

As análises de inibição enzimática foram realizadas segundo procedimentos descritos na seção 3.9 através da utilização de um ICER-AChE conectado a um sistema CLAE acoplado a um EM. Os ensaios consistem basicamente no monitoramento do produto resultante da hidrólise enzimática da ACh (Acetilcolina), a colina. Na Figura 43 está ilustrada a hidrólise enzimática da ACh (V) à colina (VI) mediada pela AChE.

**Figura 43:** Hidrólise enzimática da ACh à colina mediada pela AChE.



Nessa reação (Figura 43), após a chegada da ACh (V) ao sítio ativo da AChE, esse neurotransmissor sofre hidrólise enzimática catalisada pela AChE gerando como produtos finais da reação a colina (VI) (*m/z* 104), que é quantificada por EM, e o ácido acético (VII) [104, 107, 110].

Os resultados obtidos dos ensaios de triagem pontual de cada extrato na concentração de 200 µg/mL estão mostrados na Tabela 12, tendo a galantamina como padrão de comparação.

**Tabela 12:** Porcentagem de inibição enzimática da enzima AChE.

Porcentagem de inibição		Porcentagem de inibição	
Amostras	ICER-AChE <sub>eel</sub>	Amostras	ICER-AChE <sub>eel</sub>
<b>01IV</b>	6,70 ± 0,8	<b>01HV</b>	32,7 ± 3,3
<b>02IV</b>	14,6 ± 2,4	<b>02HV</b>	27,4 ± 0,7
<b>24IV</b>	18,0 ± 1,3	<b>24HV</b>	30,3 ± 4,1
<b>32IV</b>	13,4 ± 0,9	<b>32HV</b>	6,70 ± 0,5
<b>39IV</b>	17,1 ± 1,7	<b>39HV</b>	18,5 ± 4,0
<b>54IV</b>	16,1 ± 1,1	<b>54HV</b>	24,5 ± 0,7
<b>01II</b>	10,3 ± 4,7	<b>01HI</b>	28,4 ± 0,2
<b>02II</b>	7,60 ± 3,8	<b>02HI</b>	27,2 ± 0,3
<b>24II</b>	15,0 ± 1,1	<b>24HI</b>	24,4 ± 3,2
<b>32II</b>	11,5 ± 1,1	<b>32HI</b>	22,2 ± 0,8
<b>39II</b>	23,3 ± 1,6	<b>39HI</b>	23,2 ± 1,6
<b>54II</b>	14,4 ± 0,1	<b>54HI</b>	29,3 ± 4,5
<b>Galantamina<sup>1</sup></b>	<b>87,4 ± 2,2</b>		

<sup>1</sup>Inibidor padrão de AChE (100 µM)

Através dos resultados dispostos na Tabela 12 foi possível observar que todos os extratos estudados apresentaram baixo efeito inibidor quando comparados a galantamina (87,4%). Poucos extratos apresentaram porcentagem de inibição enzimática acima de 25%: **01HV** (32,7%), **02HV** (27,4%), **24HV** (30,3%), **01HI** (28,4%), **02HI** (27,2%) e **54HI** (29,3%). Além disso, todos os extratos hidroalcoólicos da mesma época de coleta, com exceção da **39HI** e **32HV**, apresentaram maiores atividades de inibição enzimática quando comparados aqueles preparados através do método de

infusão, considerando os acessos entre si, como, por exemplo, o **01HI** (28,4%) vs **01II** (10,3%) e o **24HV** (30,3%) vs **24IV** (18,0%).

Vinutha *et al.* [172] propôs uma classificação com relação a atividade inibitória da enzima AChE *in vitro* em estudos realizados com extratos de plantas medicinais indianas com enzimas dispersas em solução. Nestes estudos, as plantas que apresentam porcentagem de inibição acima de 50% foram considerados inibidores potentes, de 30-50% foram considerados moderadamente inibidores e aqueles com potencial de inibição abaixo de 30% foram considerados fracamente ativos frente a AChE. Assim, os extratos de *L. alba* analisados, com porcentagem de inibição acima de 25%, podem ser classificados como fracamente (**02HV**, **01HI**, **02HI** e **54HI**) e moderadamente inibidores (**01HV**, **24HV**) da AChE.

A baixa atividade anticolinesterásica da *L. alba* foi previamente relatada por Trevisan *et al.* [122], através dos estudos de triagem realizados com várias espécies de plantas. Através de seus experimentos foi possível observar a baixa atividade de inibição enzimática apresentado, neste caso, pelo extrato etanólico das folhas de *L. alba* no ensaio de microplaca. Adicionalmente, a atividade desse extrato também pôde ser verificada no ensaio de inibição por cromatografia em camada delgada (CCD).

Em trabalho publicado por Moraes *et al.* [103] foi possível verificar, através de ensaios de inibição enzimática em CCD, a potencial atividade de inibição da AChE apresentado pelo extrato hidroalcoólico (etanol:água 95:5) das partes aéreas de *L. alba*, semelhante ao controle positivo utilizado (Carbaxol). Além disso, essa espécie apresentou importante atividade antioxidante pelo método do DPPH semelhante ao padrão utilizado para a comparação (quercetina).

Em geral, a atividade biológica apresentada por determinada preparação vegetal (extrato) pode ser favorecida pelo efeito sinérgico ou aditivo entre os constituintes químicos presentes em tais preparações, isto é, a atividade biológica observada se deve a combinação de mais de uma substância química presente nestas preparações vegetais [173, 174]. Contudo, o oposto também pode ser verdadeiro (efeito antagônico), a atividade de determinado extrato

vegetal pode ser menor do que a atividade de uma fração ou composto químico obtidos desta preparação, ou seja, a fração ou o composto puro podem apresentar maiores atividades biológicas, quando testados separadamente, em comparação ao extrato bruto de origem. Além disso, o composto puro também pode apresentar maior atividade do que a fração que o contém [126, 129].

Desta forma, apesar da baixa atividade relativa de inibição da AChE apresentada pelos extratos avaliados, estudos adicionais com frações e/ou compostos químicos isolados destes extratos podem resultar em atividades de inibição da AChE melhores do que aquelas obtidas para seus respectivos extratos brutos, visto que esta espécie possui em sua composição diversos fenilpropanóides glicosilados e flavonóides (ver seção 1.5.2) que podem apresentar atividade anticolinesterásica, como previamente relatado na literatura para compostos pertencentes a essas classes [98, 175, 176].

De forma geral, através dos resultados obtidos (Tabela 12) foi possível avaliar o potencial anticolinesterásico dos extratos aquosos (infusão) e hidroalcoólicos (maceração) das folhas de diferentes acessos de *L. alba*. Com base nestes resultados, é possível supor que tanto o método de extração (Infusão e hidroalcoólico) e a sazonalidade, quanto as diferenças individuais entre os acessos são fatores que influenciaram a composição química e a atividade anticolinesterásica de extratos de *L. alba*, visto que, até certo ponto, há diferenças entre os resultados obtidos avaliando-se esses três fatores.



## 5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi obtido um método cromatográfico por CL-DAD para a discriminação química, através de *fingerprints* cromatográficos e PCA, de seis acessos de *L. alba* (Mill) N. E. Brown, coletados no verão e no inverno, a partir dos extratos aquosos (infusão) e hidroalcoólicos obtidos das suas folhas.

O método desenvolvido se mostrou adequado para a diferenciação química dos acessos de *L. alba*, possibilitando ainda a discriminação entre eles levando em consideração o método de extração e a época na qual eles foram coletados e, portanto, pode ser utilizado para o controle de qualidade desta espécie.

Os resultados obtidos a partir da estratégia de *fingerprint* cromatográfico combinada com a PCA permitiu observar que o método de extração, a sazonalidade e a individualidade de cada acesso são variáveis que devem ser consideradas quanto à utilização de plantas medicinais, nesse caso especificamente para *L. alba* (erva-cidreira), pois podem influenciar a sua composição química e seus potenciais terapêuticos.

Através desta metodologia foi possível diferenciar os extratos preparados por infusão daqueles preparados por maceração hidroalcoólica. Além disso, foi possível propor que os acessos 01, 39 e 54 não sofrem grande efeito da sazonalidade quando considerado o método de preparação hidroalcoólico. Em contrapartida, considerando o método de preparação por infusão, foi possível observar que a sazonalidade tem efeito significativo na composição química dos acessos 24, 32, 39 e 54, porém pouco influenciou quimicamente o 01 e 02, sendo estes últimos, portanto, mais resistentes quanto a variabilidade sazonal.

Analisando as dissimilaridades entre os acessos, foi possível supor que o 39 e 54 são geneticamente semelhantes, pois não foi observada a separação entre suas amostras levando em consideração cada método de preparação e época de coleta simultaneamente. Comportamento semelhante foi observado para estes acessos em estudos realizados por Blank *et al.* [4] sobre *L. alba*,

mostrando a similaridade química entre eles quanto a composição dos seus óleos essenciais.

Os resultados dos testes citotóxicos revelaram que nenhum dos extratos analisados apresentou resultado significativo com relação as linhagens de células tumorais estudadas (HL-60 e HepG2). No entanto, os extratos **01HV**, **24HV**, **01II**, **02II**, **02HI**, **24HI**, **39HI** e **54HI** apresentaram melhores desempenhos de inibição frente a linhagem HL-60, com percentual de inibição que variou de 40,0 a 52,0%, sugerindo que estes extratos são potencialmente promissores no que se refere a atividade antitumoral contra a HL-60. Nos ensaios frente as células HepG2, nenhum extrato exibiu percentual de inibição acima de 22%.

Com relação aos testes anticolinesterásicos, os extratos estudados apresentaram baixo efeito inibidor frente a AChE quando comparados a galantamina (87,4%), dos quais poucos apresentaram porcentagem de inibição enzimática acima de 25%: **01HV** (32,7%), **02HV** (27,4%), **24HV** (30,3%), **01HI** (28,4%), **02HI** (27,2%) e **54HI** (29,3%). Assim, os extratos **01HV** e **24HV** puderam ser classificados como moderadamente inibidores, enquanto que os demais foram considerados fracamente inibidores da AChE, comparativamente aos resultados relatados na literatura.

Através do isolamento realizado por CL-DAD-SPE e análises por RMN (1D e 2D) dos compostos presentes no extrato **54II** foi possível propor a estrutura da flavona tricina e do derivado fenilpropanóide verbascosídeo/isoverbascosídeo, além da classe de mais três substâncias: dois derivados de fenilpropanóides e um flavonóide diglicosilado.

A junção dos resultados obtidos por CL-DAD com aqueles das atividades biológicas apresentadas pelos extratos e a PCA possibilitou a obtenção de informações químicas e biológicas sobre *L. alba* de forma racional e objetiva. Estes resultados podem contribuir significativamente para estudos futuros com relação a esta espécie visando seu potencial terapêutico e/ou econômico.

## 6 PERSPECTIVAS DO TRABALHO

Visto que os extratos brutos apresentaram baixa atividade em ambos os testes realizados (antitumoral e anticolinesterásico), pretende-se realizar estudos adicionais com frações e compostos isolados de *L. alba* na busca por preparações e/ou compostos com maiores potenciais terapêuticos, fornecendo assim informações adicionais sobre o real potencial antitumoral e anticolinesterásico desta espécie.

Além disso, objetiva-se realizar o isolamento e identificação por RMN de todas as substâncias que mais contribuem para o agrupamento observado entre as amostras a partir da PCA neste trabalho. Através das análises de RMN é possível identificar as substâncias presentes nos extratos ou frações purificadas desta espécie, fornecendo assim informações sobre quais substâncias presentes nestas preparações estão relacionadas com as atividades biológicas observadas.

## 7 REFERÊNCIAS

- [1] LETSYO, E.; JERZ, G.; WINTERHALTER, P.; BEUERLE, T. Toxic pyrrolizidine alkaloids in herbal medicines commonly used in Ghana. *Journal of Ethnopharmacology* **2017**, 202, 154-161.
- [2] FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. *Química Nova* **2010**, 33, 1829.
- [3] CAMÊLO, L. C. A.; BLANK, A. F.; EHLERT, P. A. D.; CARVALHO, C. R. D.; BLANK, M. F. A.; MATTOS, J. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de erva-cidreira- brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br]. *Scientia Plena* **2011**, 7, 1-8.
- [4] BLANK, A. F.; CAMÊLO, L. C. A.; BLANK, M. F. A.; PINHEIRO, J. B.; ANDRADE, T. M.; NICULAU, E. S.; ALVES, P. B. Chemical Diversity in *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown Germplasm. *The Scientific World Journal* **2015**, 1-11.
- [5] PEIXOTO, M. G.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; BLANK, A. F.; LIMA, A. S.; MENEZESA, T. S. A.; SANTOS, D. A.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. H.; BACCI, L.; BLANK, M. F. A. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology* **2015**, 210, 118-122.
- [6] RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon* **2001**, 39, 603-613.
- [7] OMS – Organização Mundial da Saúde (WHO- World Health Organization). Guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. Geneva, 2004. 82 p. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js7148e/> (acessado em 05 de fevereiro de 2017).
- [8] VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura?. *Química Nova* **2005**, 28, 519-528.
- [9] GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* **2007**, 30, 374-381.

- [10] BANSAL, A.; CHHABRA, V.; RAWAL, R. K.; SHARMA, S. Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2014**, 4, 223-233.
- [11] WIESNER, J.; KNÖSS, W. Future visions for traditional and herbal medicinal Products - A global practice for evaluation and regulation? *Journal of Ethnopharmacology* **2014**, 158, 516-518.
- [12] GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* **2006**, 27, 1-93.
- [13] MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* **2002**, 25, 429-438.
- [14] MARTINS, L. R. R.; PEREIRA-FILHO, E. R.; CASS, Q. B. Chromatographic profiles of *Phyllanthus* aqueous extracts samples: a proposition of classification using chemometric models. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, 400, 469-481.
- [15] PRADO, V. M. J.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; CRUZ, E. M. O.; BLANK, A. F.; PEREIRA-FILHO, E. R.; MARTINS, L. R. R. Caracterização de chás de genótipos de *Lippia gracilis* Schauer através de perfil cromatográfico por CLAE-DAD combinado com análises quimiométricas. *Química Nova*. **2012**, 35, 1814-1818.
- [16] FUNARI, C. S.; GAMBOA, I. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZ, V. S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. *Química Nova* **2013**, 36, 1605-1609.
- [17] CUI, L.; ZHANG, Y.; SHAO, W.; GAO, D. Analysis of the HPLC fingerprint and QAMS from *Pyrrosia* species. *Industrial Crops and Products* **2016**, 85, 29-37.
- [18] BATTISTI, C.; GARLET, T. M. B.; ESSI, L.; HORBACH, R. K.; ANDRADE, A.; BADKE, M. R. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. *Revista Brasileira de Biociência* **2013**, 11, 338-348.

- [19] PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova* **2002**, 25, 45-61.
- [20] MARTÍN-DOMINGO, M. C.; PLA, A.; HERNÁNDEZ, A. F.; OLMEDO, P.; NAVAS-ACIEN, A.; LOZANO-PANIAGUAA, D.; GIL, F. Determination of metalloid, metallic and mineral elements in herbal teas. Risk assessment for the consumers. *Journal of Food Composition and Analysis* **2017**, 60, 81-89.
- [21] Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos junto a agência nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026\\_13\\_05\\_2014.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf) (acessado em 26 de março de 2017).
- [22] SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2008**, 18, 642-654.
- [23] SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2008**, 18, 618-626.
- [24] AZIZ, M. A.; KHAN, A. H.; ADNAN, M.; IZATULLAH, I. Traditional uses of medicinal plants reported by the indigenous communities and local herbal practitioners of Bajaur Agency, Federally Administrated Tribal Areas, Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology* **2017**, 198, 268-281.
- [25] AZEVEDO, S. K. S.; SILVA, I. M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **2006**, 20, 185-194.
- [26] ARGENTA, S. C.; ARGENTA, L. C.; GIACOMELLI, S. R.; CEZAROTTO, V. S. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. *Vivências* **2011**, 7, 51-60.

- [27] BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2010**, 20, 992-1000.
- [28] FALZON, C. C.; BALABANOVA, A. Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine. *Primary Care: Clinics in Office Practice* **2017**, 44, 217-227.
- [29] MELO, J. G.; MARTINS, J. D. G. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf ) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). *Acta Botanica Brasilica* **2007**, 21, 27-36.
- [30] CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MARCIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2008**, 18, 314-319.
- [31] OMS – Organização Mundial da Saúde (WHO- World Health Organization). Bulletin of the World Health Organization: Regulatory situation of herbal medicines: A worldwide review, Geneva, 1998.
- [32] FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Caderno de Pesquisa* **2011**, 18, 90-95.
- [33] BARBIERI, R.; COPPO, E.; MARCHESE, A.; DAGLIA, M.; SOBARZO-SÁNCHEZ, E.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological Research* **2017**, 196, 44-68.
- [34] BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* **2001**, 161, 839-851.
- [35] REZENDE, H. A.; COCCO, M. I. M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. *Revista da Escola de Enfermagem da USP* **2002**, 36, 282-288.

- [36] ZUCCHI, M. R.; OLIVEIRA-JÚNIOR, V. F.; GUSSONI, M. A.; SILVA, M. B.; SILVA, F. C.; MARQUES, N. E. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Ipameri - GO. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **2013**, 15, 273-279.
- [37] ZHAO, J.; DENG, J. W.; CHEN, Y. W.; LI, S. P. Advanced phytochemical analysis of herbal tea in China. *Journal of Chromatography A* **2013**, 1313, 2-23.
- [38] GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. *Eclética Química* **2011**, 36, 64-77.
- [39] WONGSA, P.; CHAIWARIT, J.; ZAMALUDIEN, A. In vitro screening of phenolic compounds, potential inhibition against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of culinary herbs in Thailand. *Food Chemistry* **2012**, 131, 964-971.
- [40] SINHA, D.; BISWAS, J.; NABAVI, S. M.; BISHAYEE, A. Tea phytochemicals for breast cancer prevention and intervention: From bench to bedside and beyond. *Seminars in Cancer Biology* **2017**.
- [41] BRAIBANTE, M. E. F.; DA SILVA, D.; BRAIBANTE, H. T. S.; PAZINATO, M. S. A Química dos Chás. *Química Nova na Escola* **2014**, 36, 168-175.
- [42] KARAK, T.; BHAGAT, R. M. Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review. *Food Research International* **2010**, 43, 2234-2252.
- [43] MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2009**, 19, 315-320.
- [44] SCOPARO, C. T.; SOUZA, L. M.; DARTORA, N.; SASSAKI, G. L.; SANTANA-FILHOA, A. P.; WERNER, M. F. P.; BORATO, D. G.; BAGGIO, C. H.; IACOMINI, M. Chemical characterization of heteropolysaccharides from green and black teas (*Camellia sinensis*) and their anti-ulcer effect. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, 86, 772-781.
- [45] JORDAN, S. A.; CUNNINGHAM, D. G.; MARLES, R. J. Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increase the



knowledge base for safety assessment. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2010**, 243, 198-216.

[46] CARMONA F.; PEREIR, A. M. S. Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2013**, 23, 379-385.

[47] LICATA, A.; MACALUSO, F. S.; CRAXÌ, A. Herbal hepatotoxicity: a hidden epidemic. *Internal and Emergency Medicine* **2013**, 8, 13-22.

[48] CARVALHO, A. C. B.; BRANCO, P. F.; FERNANDES, L. A.; MARQUES, R. F. O.; CUNHA, S. C.; PERFEITO, J. P. S. Regulação Brasileira em Plantas Medicinais e Fitoterápicos. *Revista Fitos* **2012**, 7, 5-16.

[49] SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia* **2010**, 81, 462-471.

[50] DHAMI, N.; MISHRA, A. D. Phytochemical variation: How to resolve the quality controversies of herbal medicinal products? *Journal of herbal medicine* **2015**, 5, 118-127.

[51] LIU, X.; ZHAN, H.; QIAO, Z.; ZHENG, M.; LIU, W.; FENG, F.; YAN, F. Chemometric analysis based on HPLC multi-wavelength fingerprints for prediction of antioxidant components in *Turpiniae Folium*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2016**, 152, 54-61.

[52] SUN, J.; CHEN, P. Chromatographic fingerprint analysis of yohimbe bark and related dietary supplements using UHPLC/UV/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2012**, 61, 142-149.

[53] SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd ed.; John Wiley & Sons: New Jersey, 2010.

[54] LANÇAS, F. M. Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. Editora Átomo: Campinas, 2009.

[55] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. UNICAMP: Campinas, 2006.

- [56] FORIM, M. R.; PERLATTI, B.; COSTA, E. S.; MAGNANI, R. F.; SOUZA, G. D. Concerns and Considerations about the Quality Control of Natural Products Using Chromatographic Methods. *Current Chromatography* **2015**, 2, 20-31.
- [57] DECONINCK, E.; SACRÉ, P. Y.; COURSELLE, P.; BEER, J. O. Chromatography in the Detection and Characterization of Illegal Pharmaceutical Preparations. *Journal of Chromatographic Science* **2013**, 51, 791-806.
- [58] YUDTHAVORASIT, S.; WONGRAVEE, K.; LEEPIPATPIBOON, N. Characteristic fingerprint based on gingerol derivative analysis for discrimination of ginger (*Zingiber officinale*) according to geographical origin using HPLC-DAD combined with chemometrics. *Food Chemistry* **2014**, 158, 101-111.
- [59] JIANG, Y.; DAVID, B.; TU, P.; BARBIN, Y. Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines - A review. *Analytica Chimica Acta* **2010**, 657, 9-18.
- [60] GOMES, S. V. F.; SANTOS, A. D. C.; MORAES, V. R. S.; MARTINS, L. R. R.; VIANA, M. D.; BLANK, A. F.; FILHO, E. R. P.; CASS, Q. B.; NOGUEIRA, P. C. L.; ALVES, P. B. Differentiation of *Lippia gracilis* Schauer Genotypes by LC Fingerprint and Chemometrics Analyses. *Chromatographia* **2010**, 72, 275-280.
- [61] LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica* **2009**, 1, 35-61.
- [62] SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. *Química Nova* **2011**, 34, 665-676.
- [63] LIU, X.; WU, Z.; YANG, F.; DING, H.; WU, Y. Quantitative analysis combined with chromatographic fingerprint for comprehensive evaluation of Danhong injection using HPLC-DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2013**, 76, 70-74.
- [64] LEME, G. M.; COUTINHO, I. D.; CRESTE, S.; HOJO, O.; CARNEIRO, R. L.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. HPLC-DAD method for metabolic fingerprinting of the phenotyping of sugarcane genotypes. *Analytical Methods* **2014**, 6, 7781-7788.

- [65] BOUFRIDI, A.; QUINN, R. J. Turning Metabolomics into Drug Discovery. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2016**, 27, 1334-1338.
- [66] SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. *Química Nova* **2012**, 35, 223-229.
- [67] BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 Anos de quimiometria no brasil. *Química Nova* **2006**, 29, 1401-1406.
- [68] CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. *Química Nova* **2007**, 30, 481-487.
- [69] MATOS, G. D.; PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Análise exploratória em química analítica com emprego de Quimiometria: PCA e PCA de imagens. *Revista Analytica* **2003**, 6, 38-50.
- [70] PANERO, F. S.; VIEIRA, M. F. P.; CRUZ, A. M. F.; MOURA, M. F. V. Aplicação da análise exploratória de dados na discriminação geográfica do quiabo do Rio Grande do Norte e Pernambuco. *Orbital* **2009**, 1, 228-237.
- [71] LYRA, W. S.; SILVA, E. C.; ARAÚJO, M. C. U.; FRAGOSO, W. D.; VERAS, G. Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. *Química Nova* **2010**, 33, 1594-1597.
- [72] SENA, M. M.; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. *Química Nova* **2000**, 23, 547-556.
- [73] WILSON, S. R.; MALERØD, H.; PETERSEN, D.; SIMIC, N.; BOBU, M-M.; RISE, F.; LUNDANES, E.; GREIBROKK, T. Controlling LC-SPE-NMR systems. *Journal of Separation Science* **2006**, 29, 582-589.
- [74] DEBORDE, C.; MOING, A.; ROCH, L.; JACOB, D.; ROLIN, D.; GIRAUDEAU, P. Plant metabolism as studied by NMR spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2017**, 102-103, 61-97.

- [75] JAROSZEWSKI, J. W. Hyphenated Methods in Natural Products Research, Part 2: HPLC-SPE-NMR and Other New Trends in NMR Hyphenation. *Planta Medica* **2005**, 71, 795-802.
- [76] XU, Y.-J.; CAPISTRANO, R. I.; DHOOGHE, L.; FOUBERT, K.; LEMIÈRE, F.; MAREGESI, S.; BALDÉ, A.; APERS, S.; PIETERS, L. Herbal Medicines and Infectious Diseases: Characterization by LC-SPE-NMR of Some Medicinal Plant Extracts Used against Malaria. *Planta Medica* **2011**, 77, 1139-1148.
- [77] TATSIS, E. C.; BOEREN, S.; EXARCHOU, V.; TROGANIS, A. N.; VERVOORT, J.; GEROTHANASSIS, I. P. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry* **2007**, 68, 383-393.
- [78] JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. *Scientia Chromatographica* **2010**, 2, 13-25.
- [79] SCHLOTTERBECK, G.; CECCARELLI, S. M. LC-SPE-NMR-MS: a total analysis system for bioanalysis. *Bioanalysis* **2009**, 1, 549-559.
- [80] BLUNDER, M.; ORTHABER, A.; BAUER, R.; BUCAR, F.; KUNERT, O. Efficient identification of flavones, flavanones and their glycosides in routine analysis via off-line combination of sensitive NMR and HPLC experiments. *Food Chemistry* **2017**, 218, 600-609.
- [81] MORAES, V. R. S.; THOMAS, S. S.; SPRENGER, R. F.; PRADO, V. M. J.; CRUZ, E. M. O.; CASS, Q. B.; FERREIRA, A. G.; BLANK, A. F. Secondary Metabolites from an Infusion of *Lippia gracilis* Schauer Using the LC-DAD-SPE/NMR Hyphenation Technique. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2017**, 28, 1335-1340.
- [82] MELO, J. O.; BITENCOURT, T. A.; FACHIN, A. L.; CRUZ, E. M. O.; DE JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B.; BLANK, M. F. A.; FRANCA, S. C.; BELEBONI, R. O.; FERNANDES, R. P. M.; BLANK, A. F.; SCHER, R. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. *Acta Tropica* **2013**, 128, 110-115.

- [83] Instituto Nacional de Câncer – INCA. Fisiopatologia do câncer. <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee> (acessado em 05 de julho de 2017).
- [84] PAULA, A. C.; MELO, K. M.; DA SILVA, A. M.; FERREIRA, D. A.; MONTE, F. J. Q.; SANTIAGO, G. M. P.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R.; MILITÃO, G. C. G.; DA SILVA, P. B. N.; DA SILVA, T. G. Constituintes Químicos e Atividade Citotóxica de *Cnidioscolus phyllacanthus*. *Revista Virtual de Química* **2016**, 8, 231-241.
- [85] GOMIDE, M. S.; LEMOS, F. O.; LOPES, M. T. P.; ALVES, T. M. A.; VICCINI, L. F.; COELHO, C. M. The effect of the essential oils from five different *Lippia* species on the viability of tumor cell lines. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2013**, 23, 895-902.
- [86] COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual de Química* **2010**, 2, 47-58.
- [87] SANTOS, C. P.; PINTO, J. A. O.; SANTOS, C. A.; CRUZ, E. M. O.; BLANK, M. F. A.; ANDRADE, T. M.; SANTOS, D. A.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F. Harvest time and geographical origin affect the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Industrial Crops and Products* **2016**, 79, 205-210.
- [88] ESTEVAM, E. B. B.; SILVA, E. M.; MIRANDA, M. L. D.; ALVES, J. M.; PEREIRA, P. S.; SILVA, F. G.; ESPERANDIM, V. R.; MARTINS, C. H. G.; AMBROSIO, M. A. L. V.; TÓFOLI, D.; JUNIOR, L. R. A.; ALVES, C. C. F. Avaliação das atividades antibacteriana, tripanocida e citotóxica do extrato hidroalcoólico das raízes de *Tradescantia sillamontana* Matuda (Veludo Branco) (Commelinaceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **2016**, 18, 415-422.
- [89] SILVA, E. M. F.; NASCIMENTO, R. B. C.; BARRETO, F. S.; FILHO, M. O. M.; GRIZ, S. A. S.; SANTOS, A. F.; MOUSINHO, K. C. Estudo *in vitro* do

potencial citotóxico da *Annona muricata* L. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada* **2015**, 36, 277-283.

[90] NASCIMENTO, S. C.; PEREIRA, E. C.; OLIVEIRA, A. F. M.; SILVA, N. H.; BOITARD, M.; BERIEL, H. Screening de atividade citotóxica de extratos líquênicos: cladoniaceae. *Acta Botanica Brasilica* **1994**, 8, 97-108.

[91] Instituto Nacional de Câncer – INCA. Estimativa/2014 – Incidência de Câncer No Brasil. [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca\\_ministerio\\_saude\\_apresentam\\_estimativas\\_cancer\\_2014](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014) (acessado em 05 de julho de 2017).

[92] GERETS, H. H. J.; HANON, E.; CORNET, M.; DHALLUIN, S.; DEPELCHIN, O.; CANNING, M.; ATIENZAR, F. A. Selection of cytotoxicity markers for the screening of new chemical entities in a pharmaceutical context: A preliminary study using a multiplexing approach. *Toxicology in Vitro* **2009**, 23, 319-332.

[93] HENRIKSSON E.; KJELLÉN E.; WAHLBERG P.; WENNERBERG J.; KJELLSTROM J. H. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* **2006**, 42, 320-323.

[94] O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* **2000**, 267, 5421-5426.

[95] RAMPERSAD, S. N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors* **2012**, 12, 12347-12360.

[96] MUNSHI, S.; TWINING, R. C.; DAHL, R. Alamar blue reagent interacts with cell-culture media giving different fluorescence over time: Potential for false positives. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2014**, 70, 195-198.

[97] ADEWUSI, E. A.; MOODLEY, N.; STEENKAMP, V. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected Southern African medicinal plants. *South African Journal of Botany* **2011**, 77, 638-644.

- [98] MARQUES, T. H. C.; SANTOS, P. S.; FREITAS, R. M.; CARVALHO, R. B. F.; MELO, C. H. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; LIMA, L. S. ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA E PERFIL QUÍMICO DE UMA FRAÇÃO CROMATOGRÁFICA ATIVA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES *Bellis perennis* L. (Asteraceae). *Química Nova* **2013**, 36, 549-553.
- [99] STERNER, R. M.; TAKAHASHI, P. Y.; BALLARD, A. C. Y. Active Vaccines for Alzheimer Disease Treatment. *JAMDA* **2016**, 17, 862.e11-862.e15.
- [100] VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. PRODUTOS NATURAIS COMO CANDIDATOS A FÁRMACOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DO MAL DE ALZHEIMER. *Química Nova*, **2004**, 27, 655-660.
- [101] MOTA, W. M.; BARROS, M. L.; CUNHA, P. E. L.; SANTANA, M. V. A.; STEVAM, C. S.; LEOPOLDO, P. T. G. FERNANDES, R. P. M. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **2012**, 14, 624-628.
- [102] OMENA, C. M. B.; VALENTIM, I. B.; GUEDES, G. S.; RABELO, L. A.; MANO, C. M.; BECHARA, E. J. H.; SAWAYA, A. C. H. F.; TREVISAN, M. T. S.; COSTA, J. G.; FERREIRA, R. C. S.; SANT'ANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. *Food Research International* **2012**, 49, 334-344.
- [103] MORAIS, S. M.; LIMA, K. S. B.; SIQUEIRA, S. M. C.; CAVALCANTI, E. S. B.; SOUZA, M. S. T.; MENEZES, J. E. S. A.; TREVISAN, M. T. S. Correlação entre as atividades antiradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **2013**, 15, 575-582.
- [104] VILELA, A. F. L.; SILVA, J. I. D.; VIEIRA, L. C. C.; BERNASCONI, G. C. R.; CORRÊA, A. G.; CASS, Q. B.; CARDOSO, C. L. Immobilized cholinesterases capillary reactors on-flow screening of selective inhibitors. *Journal of Chromatography B* **2014**, 968, 87-93.

- [105] AREMU, A. O.; AMOO, S. O.; NDHLALA, A. R.; FINNIE, J. F.; STADEN, J. V. Antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibition, iridoid content and mutagenic evaluation of *Leucosidea sericea*. *Food and Chemical Toxicology* **2011**, 49, 1122-1128.
- [106] YAMAGUCHI, K. K. L.; ALCANTARA, J. M.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Investiga  o do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. *Acta Amazonica* **2012**, 42, 541-546.
- [107] ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. *Revista Virtual de Química* **2016**, 8, 1818-1834.
- [108] ELLMAN, G. L. Tissue Sulfhydryl Groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1959**, 82, 70-77.
- [109] SILVA, J. I.; MORAES, M. C.; VIEIRA, L. C. C.; CORRÊA, A. G.; CASS, Q. B.; CARDOSO, C. L. Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2013**, 73, 44-52.
- [110] VANZOLINI, K. L.; VIEIRA, L. C. C.; CORRÊA, A. G.; CARDOSO, C. L.; CASS, Q. B. Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors-tandem mass spectrometry: an on-flow tool for ligand screening. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 2038-2044.
- [111] PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D. S.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* **2001**, 76, 201-214.
- [112] SANTOS, C. P.; ROCHA, D.S.; BAJAY, M. M.; SANTOS, F. R. C.; CAMPOS, J. B.; PINHEIRO, J. B.; ZUCCHI, M. I.; MANN, R. S.; BLANK, M. F. A.; BLANK, A. F. Cross-species transferability of microsatellite markers in the genus *Lippia*. *Genetics and Molecular Research* **2014**, 13, 9846-9850.
- [113] OLIVIER, D. K.; SHIKANGA, E. A.; COMBRINCK, S.; KRAUSE, R. W. M.; REGNIER, T.; DLAMINI, T. P. Phenylethanoid glycosides from *Lippia javanica*. *South African Journal of Botany* **2010**, 76, 58-63.



- [114] FUNARI, C. S.; EUGSTER, P. J.; MARTEL, S.; CARRUPT, P. A.; WOLFENDER, J. L.; SILVA, D. H. S. High resolution ultra high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species. *Journal of Chromatography A* **2012**, 1259, 167-178.
- [115] TIMÓTEO, P.; KARIOTI, A.; LEITÃO, S. G.; VINCIERI, F. F.; BILIA, A. R. A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. *Food Chemistry* **2015**, 175, 366-373.
- [116] PINÉ, R. Q.; LÓPEZ, M. H.; FUNES, L.; LINARESA, I. B.; MICOL, V.; CARRETERO, S. A.; GUTIÉRREZ, A. F. Phenylpropanoids and their metabolites are the major compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress after administration of *Lippia citriodora* in rats. *Phytomedicine* **2013**, 20, 1112-1118.
- [117] TREVISAN, M. T. S.; MARQUES, R. A.; SILVA, M. G. V.; SCHERER, D.; HAUBNER, R.; ULRICH, C. M.; OWEN, R. W. Composition of Essential Oils and Ethanol Extracts of the Leaves of *Lippia* Species: Identification, Quantitation and Antioxidant Capacity. *Records of Natural Products* **2016**, 10, 485-496.
- [118] MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução* **2008**, 27, 33-39.
- [119] ATMANI, D.; CHAHER, N.; ATMANI, D.; BERBOUCHA, M.; DEBBACHE, N.; BOUDAOUD, H. Flavonoids in Human Health: From Structure to Biological Activity. *Current Nutrition & Food Science* **2009**, 5, 225-237.
- [120] FERNANDES, L. C. B.; ALBUQUERQUE, C. C.; SALES JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, F. F. M.; GURGEL, E. P.; MESQUITA, M. V.; SILVA, M. D. S. Fungitoxicidade dos extratos vegetais e do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer sobre o fungo *Monosporascus cannonballus* Pollack e Uecker. *Summa Phytopathologica* **2015**, 41, 153-155.

- [121] PÉREZ, S.; MECKES, M.; PÉREZ, C.; SUSUNAGA, A.; ZAVALA, M. A. Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, 102, 1-4.
- [122] TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. SELEÇÃO DE PLANTAS COM ATIVIDADE ANTICOLINASTERASE PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER. *Química Nova* **2003**, 26, 301-304.
- [123] BORES, A. M. G.; GONZÁLEZ, A. M. E.; CAMPOS, A. R.; TOSCANO, S. C.; FLORES, J. C. B.; DELGADO, C. T. H.; MAYA, F. S.; MEZA, M. U.; CASTRO, I. P.; ACUÑA, C. L. C.; ACEVEDO, J. G. A. *Lippia graveolens* photochemopreventive effect against UVB radiation-induced skin carcinogenesis. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* **2017**, 167, 72-81.
- [124] ALMEIDA, M. C. S.; ALVES, L. A.; SOUZA, L. G. S.; MACHADO, L. L.; MATOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L. G.; FILHO, R. B. Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. *Química Nova* **2010**, 33, 1877-1881.
- [125] AGUIAR, J. S.; COSTA, M. C. C. D. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae): levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **2005**, 8, 79-84.
- [126] FUNARI, C. S.; PASSALACQUA, T. G.; RINALDO, D.; NAPOLITANO, A.; FESTA, M.; CAPASSO, A.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; YOUNG, M. C. M.; DURIGAN, G.; SILVA, D. H. S. Interconverting flavanone glucosides and other phenolic compounds in *Lippia salviaefolia* Cham. ethanol extracts. *Phytochemistry* **2011**, 72, 2052-2061.
- [127] FUNARI, C. S.; ALMEIDA, L.; PASSALACQUA, T. G.; MARTINEZ, I.; AMBRÓSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B.; SILVA, D. H. S.; GRAMINHA, M. A. S. Oleanonic acid from *Lippia lupulina* (Verbenaceae) shows strong *in vitro* antileishmanial and antitrypanosomal activity. *Acta Amazonica* **2016**, 46, 411-416.

- [128] LUDERE, M. T.; REE, T. V.; VLEGGAR, R. Isolation and relative stereochemistry of lippialactone, a new antimalarial compound from *Lippia javanica*. *Fitoterapia* **2013**, 86, 188-192.
- [129] CHENG, L. C.; MURUGAIYAH, V.; CHAN, K. L. Flavonoids and phenylethanoid glycosides from *Lippia nodiflora* as promising antihyperuricemic agents and elucidation of their mechanism of action. *Journal of Ethnopharmacology* **2015** 176, 485-493.
- [130] RASTRELLI, L.; CACERES, A.; MORALES, C.; SIMONE F.; AQUINO, R. Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry* **1998**, 49, 1829-1832.
- [131] CAMILLO, F. C. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson uma espécie nativa promissora para a introdução em programas nacionais de plantas medicinais e fitoterápicos. *Revista Fitos* **2016**, Supl. 1-62.
- [132] BARROS, F. M. C.; ZAMBARDA, E. O.; HEINZMANN, B. M.; MALLMANN, C. A. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Química Nova* **2009**, 32, 861-867.
- [133] JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K. A.; VIEIRA, R. F.; SILVA, D. B.; BIZZO, H. R.; GRACINDO, L. A. M. Avaliação agronômica e identificação de quimiotipos de erva cidreira no Distrito Federal. *Horticultura Brasileira* **2010**, 28: 412-417.
- [134] BARBOSA, F. G.; LIMA, M. A. S.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Lippia alba*. *Biochemical Systematics and Ecology* **2006**, 34, 819-821.
- [135] COSTA, M. C. C. D.; AGUIAR, J. S.; NASCIMENTO, S. C. Atividade Citotóxica de Extratos Brutos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). *Acta Farmacêutica Bonaerense* **2004**, 23, 349-352.
- [136] YANG, W.; HU, M.; CHEN, S.; WANG, Q.; ZHU, S.; DAI, J.; LI, X. Identification of Adulterated Cocoa Powder Using Chromatographic Fingerprints of Polysaccharides Coupled with Principal Component Analysis. *Food Analytical Methods* **2015**, 8, 2360-2367.

- [137] ZHOU, X.; TANG, L.; WU, H.; ZHOU, G.; WANG, T.; KOU, Z.; LI, S.; WANG, Z. Chemometric analyses for the characterization of raw and processed seeds of *Descurainia sophia* (L.) based on HPLC fingerprints. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2015**, 111, 1-6.
- [138] LU, Y.; GAO, B.; CHEN, P.; CHARLES, D.; YU, L. L. Characterisation of organic and conventional sweet basil leaves using chromatographic and flow-injection mass spectrometric (FIMS) fingerprints combined with principal component analysis. *Food Chemistry* **2014**, 154, 262-268.
- [139] LANÇAS, F. M. Como economizar (ou eliminar o uso de) acetonitrila em tempos de “crise”? *Scientia Chromatographica* **2009**, 1, 51-60.
- [140] SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development I. Use of a starting gradient run. *Journal of Chromatography A* **1996**, 721, 3-14.
- [141] MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. *Química Nova* **2010**, 33, 1559-1568.
- [142] SADEK, P. C. The HPLC solvent guide, 2nd ed.; John Wiley & Sons: New York, 2002.
- [143] NETO, A. J. S. Problemas com o Formato dos Picos em Cromatografia Líquida – Parte 4. *Scientia Chromatographica* **2010**, 2, 61-67.
- [144] RITSCHER, T.; TOTSCHKE, K. U. Quantification of pH-dependent speciation of organic compounds with spectroscopy and chemometrics. *Chemosphere* **2017**, 172, 175-184.
- [145] DONG, M. W. Modern HPLC for practicing scientists. John Wiley & Sons: New Jersey, 2006.
- [146] NETO, A. J. S. Problemas com o Formato dos Picos em Cromatografia Líquida – Parte 1. *Scientia Chromatographica* **2009**, 1, 69-77.
- [147] BORGES, E. M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. Possibilidades e limitações no uso da temperatura em cromatografia líquida de fase reversa. *Química Nova* **2010**, 33, 945-953.

- [148] LANÇAS, F. M. Efeitos de temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). *Scientia Chromatographica* **2012**, 4, 13-19.
- [149] NAZARIO, C. E. D.; LANÇAS, F. M. Suportes cromatográficos e fases estacionárias para cromatografia líquida: preparo, evolução e tendências. *Scientia Chromatographica* **2013**, 5, 111-135.
- [150] LANÇAS, F. M. O Renascimento das partículas superficialmente porosas ("core shell particles") em HPLC. *Scientia Chromatographica* **2010**, 2, 47-54.
- [151] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS. *Química Nova* **2004**, 27, 771-780.
- [152] HE, J.; WU, X.; KUANG, Y.; WANG, T.; BI, K.; LI, Q. Quality assessment of *Chrysanthemum indicum* Flower by simultaneous quantification of six major ingredients using a single reference standard combined with HPLC fingerprint analysis. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2016**, 11, 265-272.
- [153] BAJOUB, A.; MEDINA-RODRÍGUEZ, S.; GÓMEZ-ROMERO, M.; AJAL, E. A.; BAGUR-GONZÁLEZ, M. G.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; CARRASCO-PANCORBO, A. Assessing the varietal origin of extra-virgin olive oil using liquid chromatography fingerprints of phenolic compound, data fusion and chemometrics. *Food Chemistry* **2017**, 215, 245-255.
- [154] SUN, Z.; ZHAO, L.; CHENG, N.; XUE, X.; WU, L.; ZHENG, J.; CAO, W. Identification of botanical origin of Chinese unifloral honeys by free amino acid profiles and chemometric methods. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2017**, 7, 317-323.
- [155] PARDO-MATES, N.; VERA, A.; BARBOSA, S.; HIDALGO-SERRANO, M.; NÚÑEZ, O.; SAURINA, J.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; PUIGNOU, L. Characterization, classification and authentication of fruit-based extracts by means of HPLC-UV chromatographic fingerprints, polyphenolic profiles and chemometric methods. *Food Chemistry* **2017**, 221, 29-38.
- [156] ASHOUR, M. A. Isolation, HPLC/UV characterization and antioxidante activity of phenylethanoids from *Blepharis edulis* (Forssk.) Pers. growing in Egypt. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University* **2012**, 50, 67-72.

- [157] AWAD, M. M.; RAGAB, E. A.; EL-HELA, A. A. Phytochemical investigation and biological evaluation of *Dichanthium annulatum* (Forssk). *Journal of Scientific and Innovative Research* **2015**, 4, 131-137.
- [158] FROELICH, S.; GUPTA, M. P.; SIEMS, K.; JENETT-SIEMS, K. Phenylethanoid glycosides from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae, a traditional antimalarial medicinal plant. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2008**, 18, 517-520.
- [159] OLIVEIRA, D. M. S.; MIGUEL, M. D.; KALEGARI, M.; MIGUEL, O. G.; MOREIRA, T. F. Isolamento do verbacosídeo e validação de método analítico para padronização do extrato bruto das partes aéreas de *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltdl. (Scrophulariaceae). *Química Nova* **2014**, 37, 344-348.
- [160] NAN, Z.; ZENG, K.; SHI, S.; ZHAO, M.; JIANG, Y.; TU, P. Phenylethanoid glycosides with anti-inflammatory activities from the stems of *Cistanche deserticola* cultured in Tarim desert. *Fitoterapia* **2013**, 89, 167-174.
- [161] JING, Z.; YING, W.; XIAO-QI, Z.; QING-WEN, Z.; WEN-CAI, Y. Chemical Constituents from the Leaves of *Lophatherum gracile*. *Chinese Journal of Natural Medicines* **2009**, 7, 428-431.
- [162] CHANG, C. L.; WANG, G. J.; ZHANG, L. J.; TSAI, W. J.; CHEN, R. Y.; WU, Y. C.; KUO, Y. H. Cardiovascular protective flavonolignans and flavonoids from *Calamus quiquesetinervius*. *Phytochemistry* **2010**, 71, 271-279.
- [163] GOMAA, N. H.; ABDELGAWAD, H. R. Phytotoxic effects of *Echinochloa colona* (L.) Link. (Poaceae) extracts on the germination and seedling growth of weeds. *Spanish Journal of Agricultural Research* **2012**, 10, 492-501.
- [164] ALVES, V. G.; SOUZA, A. G.; CHIAVELLI, L. U. R.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; POMINI, A. M.; SILVA, C. C. Phenolic compounds and anticancer activity of commercial sugarcane cultivated in Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **2016**, 88, 1201-1209.
- [165] NGUYEN, D. H.; ZHAO, B. T.; LE, D. D.; KIM, K. Y.; KIM, Y. H.; YOON, Y. H.; KO, J. Y.; WOO, K. S.; WOO, M. H. Phenolic Constituents and Their Anti-inflammatory Activity from *Echinochloa utilis* Grains. *Natural Product Sciences* **2016**, 22, 140-145.

- [166] OLIVEIRA, D. M.; SIQUEIRA, E. P.; NUNES, Y. R. F.; COTA, B. B. Flavonoids from leaves of *Mauritia flexuosa*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2013**, 23, 614-620.
- [167] YANG, Z.; NAKABAYASHI, R.; OKAZAKI, Y.; MORI, T.; TAKAMATSU, S.; KITANAKA, S.; KIKUCHI, J.; SAITO, K. Toward better annotation in plant metabolomics: isolation and structure elucidation of 36 specialized metabolites from *Oryza sativa* (rice) by using MS/MS and NMR analyses. *Metabolomics* **2014**, 10, 543-555.
- [168] PAPOUTSI, Z.; KASSI, E.; MITAKOU, S.; ALIGIANNIS, N.; TSIAPARA, A.; CHROUSOS G. P.; MOUTSATSOU, P. Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **2006**, 98, 63-71.
- [169] MURTHY, K. N. C.; KIM, J.; VIKRAM, A.; PATIL, B. S. Differential inhibition of human colon cancer cells by structurally similar flavonoids of citrus. *Food Chemistry* **2012**, 132, 27-34.
- [170] IBRAHIM, A.; SOBEH, M.; ISMAIL, A.; ALAA, A.; SHEASHAA, H.; SOBH, M.; BADRIA, F. Free-B-Ring flavonoids as potential lead compounds for colon cancer therapy. *Molecular and Clinical Oncology* **2014**, 2, 581-585.
- [171] ENCALADA, M. A.; REHECHO, S.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I.; CAVERO, R. Y.; CALVO, M. I. Antiproliferative effect of phenylethanoid glycosides from *Verbena officinalis* L. on Colon Cancer Cell Lines. *LWT - Food Science and Technology* **2015**, 63, 1016-1022.
- [172] VINUTHA, B. PRASHANTH, D.; SALMA, K.; SREEJA, S. L.; PRATITI, D.; PADMAJA, R.; RADHIKA, S.; AMIT, A.; VENKATESHWARLU, K.; DEEPAK, M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, 109, 359-363.
- [173] EID, S. Y.; EL-READI, M. Z.; WINK, M. Digitonin synergistically enhances the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells. *Phytomedicine* **2012**, 19, 1307-1314.

- [174] YANG, Y.; ZHANG, Z.; LI, S.; YE, X.; LI, X.; HE, K. Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia* **2014**, 92, 133-147.
- [175] GEORGIEV, M.; ALIPIEVA, K.; ORHAN, I.; ABRASHEV, R.; DENEV, P.; ANGELOVA, M. Antioxidant and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. and its phenylethanoid glycosides. *Food Chemistry* **2011**, 128, 100-105.
- [176] TREVISAN, M. T. S.; BEZERRA, M. Z. B.; SANTIAGO, G. M. P.; FEITOSA, C. M.; VERPOORTE, R.; BRAZ FILHO, R. ATIVIDADES LARVICIDA E ANTICOLINESTERÁSICA DE PLANTAS DO GÊNERO *Kalanchoe*. *Química Nova* **2006**, 29, 415-418.